

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Šárka Veselá

**Využití průtokové cytometrie pro diagnostiku
a charakterizaci dědičných poruch glykosylace**

**Flow cytometry in the diagnostics and characterization
of congenital disorders of glycosylation**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

Konzultant: RNDr. Nina Ondrušková, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne Podpis

Abstrakt

Dědičné poruchy glykosylace (CDG) jsou vzácná multisystémová metabolická onemocnění, jejichž počet v posledních letech výrazně narůstá. Projevují se velmi širokým spektrem klinických příznaků. Ve většině případů jsou způsobeny mutací genů kódujících enzymy glykosylační dráhy. Na základě typu poruchy jsou syndromy CDG děleny do skupin: poruchy *N*-glykosylace nebo *O*-glykosylace proteinů, defekty v modifikaci proteinů pomocí GPI kotvy, defekty glykosylace lipidů a poruchy více glykosylačních drah zároveň.

Cílem práce bylo najít nové biochemické analýzy vhodné pro diagnostiku a charakterizaci pacientů s CDG. Pro vybrané markery (*Sambucus Nigra* (SNA) lektin, proaerolysin (FLAER), protilátky proti proteinům CD55 a CD59) byly optimalizovány experimentální podmínky a značení byla následně aplikována na kultivované kožní fibroblasty kontrol a vybraných pacientů s CDG (ATP6AP1-CDG, PIGN-CDG, SLC10A7-CDG, deficit PISD) diagnostikovaných na základě celoexomového sekvenování. Experimenty byly prováděny za použití průtokové cytometrie (FACS) a fluorescenční mikroskopie (FM).

Byla dosažena optimalizace detekce sializace pomocí SNA lektinu i analýzy změn mitochondriálního membránového potenciálu pomocí fluorescenčně značené sondy JC-1 se simulací defektu mitochondrií pomocí FCCP. Analýzou FACS i FM byla prokázána výrazně snížená exprese proteinu CD55 u pacientů s defektem PIGN-CDG i deficitem PISD ve srovnání s kontrolami. Naopak změna exprese GPI markeru FLAER ani proteinu CD59 pomocí FACS nalezena nebyla. Významný pokles signálu pro CD59 u defektu PIGN-CDG však potvrdila FM. Na základě pilotních výsledků lze předpokládat snížené množství proteinu CD55 u defektu PIGN-CDG i deficitu PISD. V případě syndromu PIGN-CDG zřejmě dochází i k ovlivnění proteinu CD59.

Přínosem této práce je optimalizace experimentálních podmínek pro aplikaci specifických markerů GPI kotvy. Tato technika bude využita při diagnostice u pacientů se syndromy CDG spojenými s defekty biosyntézy GPI kotvy, které nelze zachytit běžně používanou isoelektrickou fokusací sérového transferinu.

Klíčová slova: dědičné poruchy glykosylace, glykany na povrchu buňky, fibroblasty, lektiny, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie

Abstract

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are rare multisystem metabolic diseases and their number has rapidly grown in recent years. The clinical manifestation includes very broad spectrum of symptoms. In most of all cases CDG are caused by mutations in genes encoding the enzymes of glycosylation pathway. Based on the type of defect, CDG are divided into the following groups: disorders of *N*-glycosylation or *O*-glycosylation of proteins, defects in modification of proteins by GPI anchor, disorders of lipid glycosylation and defects that impact multiple glycosylation pathways.

The aim of the thesis was to find new biochemical analyses suitable for diagnostics and characterization of CDG patients. The experimental conditions were optimized for selected markers (*Sambucus Nigra* (SNA) lectin, proaerolysin (FLAER), antibodies to proteins CD55 and CD59) and the staining was applied to cultivated skin fibroblasts from controls and patients diagnosed with CDG by whole-exome sequencing (ATP6AP1-CDG, PIGN-CDG, SLC10A7-CDG, PISD deficiency). The experiments were performed using flow cytometry (FACS) and fluorescent microscopy (FM).

The detection of sialylation by SNA lectin and analysis of the mitochondrial membrane potential changes by a fluorescent labelled probe JC-1 with FCCP simulation of mitochondrial defect were optimized. In comparison to controls, a significantly lower expression of protein CD55 in the patients with PIGN-CDG and PISD deficiency was proved by FACS and FM. No differences between controls and patients were detected in the expression of GPI marker FLAER or protein CD59 using FACS. However, a significant reduction of the CD59 signal in PIGN-CDG was shown by FM. Based on the pilot experiments, we assume decreased level of protein CD55 in PIGN-CDG as well as in PISD defect. The protein CD59 is also probably affected in PIGN-CDG.

This study brings the optimalization of experimental conditions for labelling with specific GPI anchor markers. This technique will be utilized in the diagnostics of patients with CDG caused by defects in the GPI anchor biosynthesis, which cannot be captured by routinely used isoelectric focusing of serum transferrin.

Key words: congenital disorders of glycosylation, cell surface glycans, fibroblasts, lectins, flow cytometry, fluorescent microscopy

[IN CZECH]

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat RNDr. Nině Ondruškové, Ph.D. za její ochotu, spolupráci a přínosné konzultace. Dále děkuji doc. MUDr. Janu Živnému, PhD. a Ing. Martinu Báječnému z Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK za pomoc s měřením a analýzou dat na průtokovém cytometru a také Ing. Nikol Volfové za cenné rady při práci s fluorescenčním mikroskopem. Moje poděkování patří celému kolektivu Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch za přátelskou atmosféru a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě pak děkuji rodině za podporu po celou dobu studia.

Diplomová práce vznikla za podpory následujících projektů:

SVV 260367 Univerzity Karlovy

8F 19002 EURO-GLYCAN-OMICS (MŠMT)

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů.....	8
1 Literární přehled	12
1.1 Glykosylace.....	12
1.1.1 Obecný mechanismus glykosylace	12
1.1.2 <i>N</i> -glykany.....	14
1.1.3 <i>O</i> -glykany	15
1.1.4 Glykosylfosfatidylinositolová kotva.....	17
1.2 Dědičné poruchy glykosylace	19
1.2.1 Poruchy <i>N</i> -glykosylace	21
1.2.2 Poruchy <i>O</i> -glykosylace.....	22
1.2.3 Poruchy syntézy GPI kotvy	24
1.3 Diagnostika CDG	25
1.3.1 Biomarkery pro diagnostiku CDG	26
1.3.2 Metody pro vyšetření CDG.....	29
1.4 Průtoková cytometrie	31
1.5 Fluorescenční mikroskopie	33
2 Cíle práce	34
3 Materiál a metody	35
3.1 Použitý biologický materiál	35
3.2 Použité chemikálie	37
3.2.1 Čisté chemikálie a komerčně dodávané roztoky.....	37
3.2.2 Roztoky připravené v laboratoři	38
3.3 Použité přístroje	38
3.4 Použité počítačové programy	39

3.5	Použité metody	40
3.5.1	Kultivace fibroblastů	40
3.5.2	Průtoková cytometrie	41
3.5.3	Fluorescenční mikroskopie	48
4	Výsledky	51
4.1	Stanovení sializace ve fibroblastech značených SNA lektinem	51
4.2	Stanovení exprese specifických markerů GPI kotvy ve fibroblastech	54
4.3	Stanovení membránového potenciálu v mitochondriích fibroblastů značených sondou JC-1	62
5	Diskuze	65
6	Souhrn	71
	Seznam použité literatury	72
	Přílohy	86

Seznam použitých zkratek a symbolů

A1AT	α_1 -antitrypsin
ADP	adenosindifosfát
ALP	alkalická fosfatasa
Asn	asparagin
ATB	antibiotický a antimykotický roztok
ATP	adenosintrifosfát
apoC-III	apolipoprotein C-III
BP	speciální filtr pro fluorescenci propouštějící specifické rozmezí vlnových délek (z angl. <i>band pass</i>)
CD	diferenciační skupina (z angl. <i>cluster of differentiation</i>)
CD55	fluorescenčně značená protilátka Anti-Hu CD55
CD59	fluorescenčně značená protilátka Anti-Hu CD59
CDG	dědičné poruchy glykosylace (z angl. <i>congenital disorders of glycosylation</i>)
COG	konzervovaný oligomerní komplex lokalizovaný v Golgiho aparátu
Da/kDa	dalton/kilodalton
DAF	protein CD55 (z angl. <i>decay accelerating factor</i>)
DMEM	kultivační médium
DMSO	dimethylsulfoxid
Dol/Dol-P/Dol-P-P	dolichol/dolicholfosfát/dolicholpyrofosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. <i>epidermal growth factor</i>)
ER	endoplazmatické retikulum

EtNP	ethanolaminfosfát
FACS	průtoková cytometrie (z angl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. <i>fetal bovine serum</i>)
FCCP	karbonylkyanid- <i>p</i> -trifluormethoxyfenylhydrazon
FLAER	fluorescenčně značený toxin proaerolysin
FM	fluorescenční mikroskopie
Fru-6-P	fruktosa-6-fosfát
FSC	přímý rozptyl (z angl. <i>forward angle scatter</i>)
Fuc	fukosa
GA	Golgiho aparát
GAG	glykosaminoglykan
Gal	galaktosa
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin
GDP	guanosindifosfát
Glc	glukosa
GlcA	glukuronová kyselina
GlcN	glukosamin
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GPI-APs	GPI-vázané proteiny (z angl. <i>glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins</i>)
H ⁺	protony
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)

IdoA	iduronová kyselina
IEF	isoelektrická fokusace
iFBS	inaktivované fetální hovězí sérum
JC-1	sonda mitochondriálního membránového potenciálu
LLO	na lipid vázaný oligosacharid (z angl. <i>lipid-linked oligosaccharide</i>)
LP	speciální filtr pro fluorescenci propouštějící vlnové délky vyšší než je specifikovaná vlnová délka (z angl. <i>long pass</i>)
Man	mannosa
MCAHS	z angl. <i>multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome</i>
MIRL	protein CD59 (z angl. <i>membrane inhibitor of reactive lysis</i>)
MPI	fosfomannoisomerasa
MK	mastná kyselina
n	počet opakování
N	asparagin
Neu	neuraminidasa
NGS	sekvenování nové generace (z angl. <i>next-generation sequencing</i>)
PBS	fosfátový pufr
PFA	paraformaldehyd
PGAP	z angl. <i>post GPI attachment to proteins</i>
PGM1	fosfoglukomutasa 1
PMM	fosfomannomutasa
PMT	fotonásobiče (z angl. <i>photomultiplier tubes</i>)
PNA	fluorescenčně značený <i>Peanut Agglutinin</i> lektin
PNH	paroxysmální noční hemoglobinurie

PI	fosfatidylinositol
PIG	z angl. <i>phosphatidyl inositol glycan</i>
S	serin
Sia	kyselina sialová
SNA	fluorescenčně značený <i>Sambucus Nigra</i> lektin
SP	speciální filtr pro fluorescenci propouštějící vlnové délky nižší než je specifikovaná vlnová délka (z angl. <i>short pass</i>)
SSC	boční rozptyl (z angl. <i>side angle scatter</i>)
T	threonin
Tf	transferin
T + E	roztok trypsinu
UDP	uridindifosfát
UMP	uridinmonofosfát
WES	celoexomové sekvenování (z angl. <i>whole exome sequencing</i>)
Xyl	xylosa

1 Literární přehled

1.1 Glykosylace

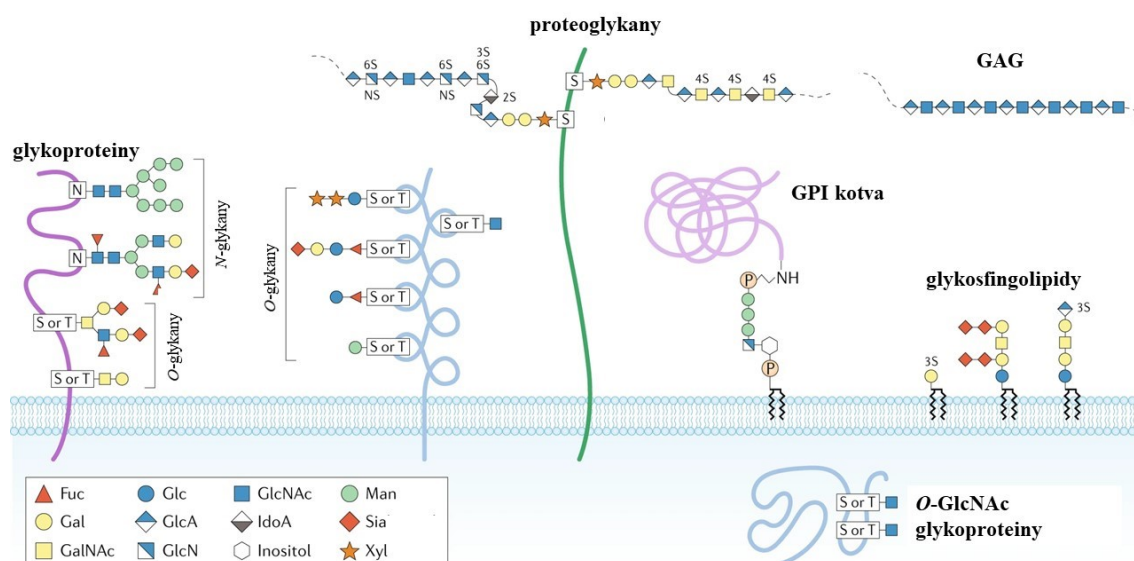
Glykosylace je nejčastější kotranslační a posttranslační modifikací proteinů a lipidů, jejímž výsledkem je vznik tzv. glykokonjugátů. Uvádí se, že až polovina bílkovin člověka je glykosylována [1]. Samotné proteiny zajišťují v lidském organismu řadu funkcí, podmiňují strukturu buněk a orgánů, fungují jako biokatalyzátory, jsou zdrojem a zásobárnou aminokyselin, důležitou roli hrají při buněčném transportu či se podílejí na regulačních pochodech v buňce [2]. Glykosylace proteinů může měnit jejich aktivitu v signalizačních a regulačních reakcích, v některých případech slouží jako ochrana před proteolytickými enzymy, má vliv na jejich stabilitu a acidobazické vlastnosti, avšak v mnoha případech není význam glykosylace zatím zcela objasněn [3].

Glykosylace je nejenom nejčastější, ale rovněž nejrozmanitější posttranslační modifikací (Obrázek 1.1, str. 13) [4]. Tato rozmanitost je dána především rozdílnou stavbou glykanů, což jsou oligosacharidy a polysacharidy připojující se kovalentní vazbou na protein (bílkovinnou část glykoproteinu označujeme jako aglykon) [5]. Monosacharidy, tvořící glykanové řetězce, se vyskytují ve formě anomerů (α , β), mohou tvořit vazby v odlišných pozicích a rovněž mohou být modifikovány navázáním různých funkčních skupin. Díky tomu vznikají rozdílné struktury lišící se nejenom složením a počtem monosacharidových jednotek, ale i polohou glykosidických vazeb a větvením [6]. A přestože v lidském těle existuje omezené množství monosacharidů, lze jejich kombinacemi získat obrovské množství glykanů. Monosacharidy, které se běžně vyskytují v glykoproteinech, jsou například D-glukosa (Glc), D-galaktosa (Gal), D-mannosa (Man), *N*-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc), *N*-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc), L-fukosa (Fuc), D-xyloza (Xyl), uronové kyseliny nebo sialové kyseliny, z nichž nejznámější je *N*-acetylneuraminová kyselina [7].

1.1.1 Obecný mechanismus glykosylace

Glykokonjugáty nejsou na rozdíl od proteinů primárními produkty genů. Proteiny, vznikající translací, podléhají reakcím, v nichž jsou na ně enzymaticky připojovány glykany [8]. Na základě charakteru kovalentní vazby mezi proteinovou částí a glykanem lze rozlišit tři typy glykosylace. Napojení prostřednictvím amidové skupiny asparaginu označujeme jako *N*-glykosylaci; *O*-glykosylace probíhá přes hydroxylové skupiny serinu

nebo threoninu; posledním typem je pak C-glykosylace, která může vznikat vazbou mezi uhlíky glykanu a tryptofanu [9].



Obrázek 1.1: Nejdůležitější typy glykosylací. Glykanová struktura se může kovalentně vázat na proteiny či lipidy. N-glykoproteiny vznikají vazbou mezi N-acetylglukosaminem (GlcNAc) v glykanovém řetězci a amidovou skupinou asparaginu (N). Nejrozmanitější O-glykoproteiny jsou dále rozděleny do skupin podle druhu monosacharidu, který se jako první váže na serin (S) nebo threonin (T). Patří sem muciny, které se vážou prostřednictvím N-acetylgalaktosaminu (GalNAc); O-glykoproteiny vyskytující se ve specifických proteinových doménách, které obsahují O-vázanou fukosu (Fuc) nebo mannosu (Man); dále pak glykoproteiny s O-vázaným GlcNAc, ve kterých je sacharidová složka typicky tvořena pouze GlcNAc. V proteoglykanech převažuje glykanová složka tvořená dlouhým lineárním řetězcem polysacharidu (glykosaminoglykanu, GAG) nad proteinovou částí. Mohou obsahovat celou řadu monosacharidů jako je xyloza (Xyl), galaktosa (Gal), glukuronová kyselina (GlcA), glukosamin (GlcN), iduronová kyselina (IdoA), GlcNAc nebo GalNAc. Další skupinou glykosylovaných sloučenin jsou glykosfingolipidy, které tvoří hlavní skupinu glykolipidů a často jsou bohaté na kyselinu sialovou (Sia). Glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva, jejíž důležitou složku tvoří inositol, zajišťuje propojení proteinů s membránovými lipidy. Převzato z [10], upraveno.

Obecně můžeme syntézu glykokonjugátů rozdělit do čtyř fází. V první fázi dochází k aktivaci monosacharidů v cytoplasmě buňky. Monosacharidy, které přijímáme v potravě nebo které vznikají různými metabolickými procesy v lidském těle, reagují s nukleosidtrifosfáty za vzniku cukerných donorů s vysokou energií. Ve druhé fázi je pak nutné aktivované monosacharidy dopravit přes membránu do lumen endoplazmatického retikula (ER) a Golgiho aparátu (GA), kde probíhají další reakce. Ve třetí fázi je za pomoci specifických glykosyltransferas vázaných v membránách ER a GA regulována

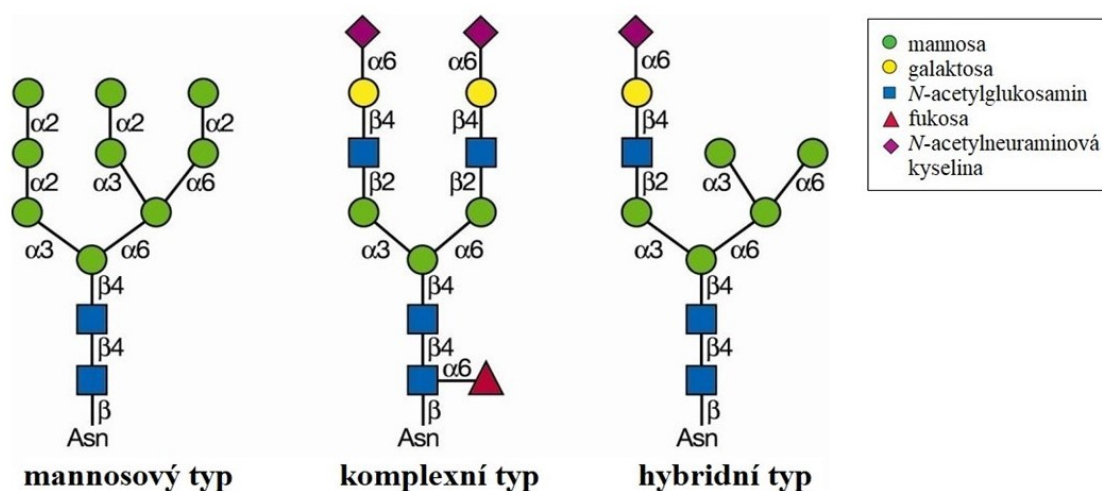
syntéza glykanu a jeho napojení na protein či lipid. Tyto procesy jsou přísně řízeny substrátovou specifitou enzymů. Syntetizované glykoproteiny a také glykosyltransferasy se hromadí v cisternách GA odkud jsou prostřednictvím vezikulů sekretovány ven z buňky. Finální úpravy glykoproteinů a doprava přes transportní mechanismy GA bývá označována jako čtvrtá fáze glykosylace [11, 12].

1.1.2 *N*-glykany

Biosyntéza *N*-glykanů začíná na cytoplazmatické straně membrány ER. Aktivovaný cukerný donor UDP-GlcNAc se na vnější straně ER váže na fosforylovaný dolichol (Dol-P) [12]. Dolicholfosfát je fosforečný ester alkoholu dolicholu, který se v membráně ER vyskytuje ve vysokém množství. Jeho hydrofobní část je zanořena do membrány ER, zatímco jeho fosfátová skupina se uplatňuje právě při přenosu sacharidové jednotky [13]. Po navázání sacharidu na Dol-P dochází k oddělení nukleotidové části donoru, vznikne dolicholpyrofosfát-*N*-acetylglukosamin, na který je následně připojena druhá molekula GlcNAc a pět mannosových zbytků, které do reakce vstupují v jejich aktivovaných formách UDP-GlcNAc a GDP-Man. Tento heptasacharid připojený na přenašeč Dol-P ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$) je převrácen přes membránovou dvojvrstvu do lumen ER. Zde je $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ rozšířen dalšími čtyřmi molekulami Man z Dol-P-Man a následně jsou připojeny tři Glc z Dol-P-Glc [14]. Takto připravený prekurzor, na lipid vázaný oligosacharid (LLO, z angl. *lipid-linked oligosaccharide*), je připraven na přenos na nascentní protein, konkrétně na sekvenci asparagin-X-serin/threonin, kde X je libovolná aminokyselina kromě prolinu. Tato reakce je katalyzována multienzymovým komplexem oligosacharidtransferasou, energie pro reakci se získá štěpením vazby GlcNAc-P a současně je odstraněna skupina Dol-P-P [15]. Po připojení *N*-glykanu na protein následuje řada reakcí zkracujících oligosacharidovou část. První z nich probíhají u všech eukaryot a mají klíčovou roli při sbalování glykoproteinů na chaperonech ER. Dochází k odstranění glukosových jednotek působením α -glukosidasy I a II. Následně mohou být odštěpeny i mannosové zbytky za katalytického působení několika mannosidas. Po těchto procesech *N*-glykany opouští ER a syntéza pokračuje v GA. V GA probíhají nejrozličnější modifikace glykanových struktur, sacharidové řetězce podléhají působení dalších glykosidas a glykosyltransferas [10, 14].

Výsledkem procesů v GA jsou tři základní typy struktury *N*-glykanů [12]. Struktury mají společné pentasacharidové jádro (z angl. *core*), liší se však monosacharidovými jednotkami, které jsou na něj dále vázané. Prvním typem jsou

N-glykany s vysokým obsahem mannosy, které obsahují ve svém řetězci pět až devět pouze mannosových zbytků. Druhým typem jsou komplexní *N*-glykany, u kterých dochází k téměř úplnému odštěpení mannosových jednotek a zachováno zůstává pouze jádro. Na jeho koncové mannosy se navazují rozdílné monosacharidové jednotky, které tvoří tzv. antény. Tyto řetězce mohou mít rozdílné složení a jejich struktura je velmi rozmanitá. Existují komplexní *N*-glykany, které nesou dvě až čtyři antény s rozdílným složením. Posledním typem jsou pak *N*-glykany hybridní, které mají jednu anténu tvořenou pouze mannosovými jednotkami a druhá anténa je komplexní [16, 17]. Porovnání jednotlivých strukturních typů *N*-glykanů je na Obrázku 1.2.



Obrázek 1.2: Typy *N*-glykanů. Tři rozdílné struktury řetězce *N*-glykanů, které mají společné pentasacharidové jádro vázající se na asparagin (Asn). Antény mannosových *N*-glykanů jsou tvořeny pouze mannosami, komplexní typ obsahuje řetězce rozdílných monosacharidů a hybridní typ je kombinací obou, jedna anténa je složena čistě z molekul mannosy a druhá je pak kombinací více druhů monosacharidů. Převzato z [14], upraveno.

1.1.3 O-glykany

Kovalentní vazba *O*-glykoproteinů vzniká mezi glykanem a nejčastěji serinem nebo threoninem, méně často pak tyrosinem, hydroxylysinem nebo hydroxyprolinem [18]. Na rozdíl od syntézy *N*-glykanů, kde je celý polysacharidový řetězec připojován na protein najednou, u *O*-glykanů jsou monosacharidové jednotky přidávány postupně [8]. V porovnání s *N*-glykosylací rovněž není třeba žádný lipidový prekurzor pro přenos monosacharidů přes membránu ER. V lidském těle bylo nalezeno sedm typů *O*-glykanových struktur, jež se dělí podle typu monosacharidu, na který se přímo váže bílkovinná část [19].

Nejvýznamnějším a také nejrozšířenějším typem *O*-glykanů v lidském organismu jsou muciny. Muciny se vyskytují v mnoha epiteliálních tkáních, jsou sekretovány především v dýchacích cestách nebo trávicím a vylučovacím traktu. Jejich důležitou úlohou je ochrana před fyzickým i chemickým poškozením a rovněž zajišťují obranu proti patogenům [20]. Syntéza *O*-glykanů mucinového typu začíná napojením GalNAc z molekuly UDP-GalNAc na hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu [18]. Tato reakce je katalyzována enzymem polyprotein-*N*-acetyl-galaktosamintransferasou, u kterého je možné rozlišit nejméně 21 podtypů na základě rozdílné aminokyselinové sekvence. Všechny tyto podtypy jsou schopné navázat GalNAc, ale odlišují se proteinovým substrátem, na který tuto skupinu přenáší. Poté následuje navázání druhé monosacharidové jednotky. Uvedenými reakcemi se vytvoří základní mucinové jádro, které se liší druhem připojeného monosacharidu a také způsobem jeho vazby na GalNAc [18]. Dosud bylo rozlišeno osm struktur, z nich sedm se vyskytuje v různých tkáních lidského těla [21]. Většina těchto mucinových jader je pak dále substituována za přítomnosti specifických glykosyltransferas.

Dalším rozšířeným typem *O*-glykosylace je navázání jediného monosacharidu GlcNAc pomocí *N*-acetylglukosaminyltransferasy, zatímco jeho odštěpení katalyzuje enzym *N*-acetylglukosaminidasa [22]. Tato *O*-glykosylace se odehrává v jádře, cytoplazmě a v menší míře mitochondriích, čímž se významně odlišuje od ostatních typů glykosylací [23]. Díky výše zmíněným enzymům může docházet k cyklickému připojování a odštěpování GlcNAc zbytku, což je druhým specifickým znakem tohoto druhu glykosylace. To, že je modifikace dynamická, umožňuje regulovat celou řadu buněčných pochodů skrze modulaci aktivity proteinů, podobně jako je tomu například u fosforylace a defosforylace [24].

Z dalších mechanismů *O*-glykosylace určitě stojí za zmínku tvorba glykosaminoglykanů (GAG), což jsou molekuly obsahující dlouhá vlákna nerozvětvených polysacharidů, která se často vážou na protein přes xylosu a tvoří tak proteoglykany. Proto bývá tento proces někdy označován jako *O*-xylosylace. Molekuly GAG i proteoglykany jsou součástí mezibuněčné hmoty v pojivech a zastávají hlavně strukturní funkci, jsou to například kyselina hyaluronová, dermatansulfát, chondroitinsulfát nebo heparansulfát [19]. Základní stavební hmotou pojiv jsou vlákna kolagenu, která obsahují glykany *O*-vázané přes galaktosu. Ty jsou tvořené Gal nebo disacharidem Glc(1→2)Gal navázaným na hydroxylysinový či hydroxyprolinový

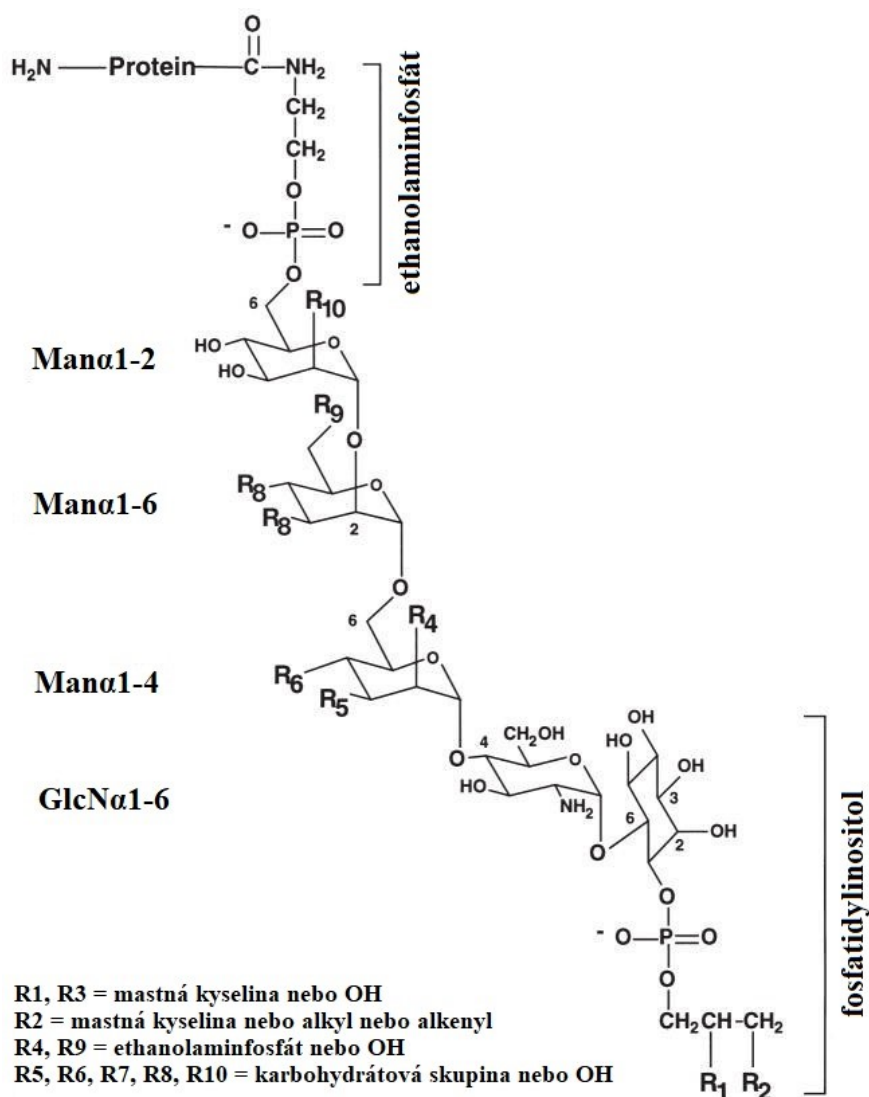
zbytek proteinu [25]. Méně rozšířená je *O*-mannosylace, jejíž produkty lze najít především v nervové soustavě nebo kosterním svalstvu. Nejznámějším *O*-mannosylovaným proteinem je pak α -dystroglykan, který propojuje cytoskelet s extracelulární matrix [26]. Existuje také *O*-glukosylace a *O*-fukosylace, které jsou spjaty s regiony opakujícími motiv epidermálního růstového faktoru (EGF, z angl. *epidermal growth factor*) nebo s oblastmi s opakováním sekvence thrombospondinu. V tomto případě je *O*-glykosylace velmi důležitá pro procesy tvorby a rozpouštění krevních sraženin. Zvýšená modifikace v EGF regionech může být signálem vzniku zánětu nebo raného rozvoje rakoviny [27, 28].

1.1.4 Glykosylfosfatidylinositolová kotva

Glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva je molekulární aparát, prostřednictvím kterého jsou proteiny periferně připojovány na buněčnou membránu. Jedná se o posttranslační modifikaci v ER regulovanou několika geny [29]. Všechny dosud popsané GPI kotvy mají shodnou základní strukturu tvořenou ze tří složek – lipid fosfatidylinositol (PI), tetrasacharidový řetězec obsahující tři Man a jeden glukosamin (GlcN) a ethanolaminfosfát (EtNP) [30]. Tato struktura je znázorněna na Obrázku 1.3 (str. 18). Další modifikace tohoto řetězce se liší v závislosti na druhu organismu a typu buněk, ve kterém se GPI kotvy vyskytují, a rovněž jsou významně podmíněny proteinem, který je na kotvu připojován [29].

Výzkumem GPI kotev z různých organismů bylo v průběhu první poloviny 90. let prokázáno, že stejně tak jako zůstává neměnné složení jejich jádra, tak i mechanismus tvorby této struktury je konzervovaný. Celý proces syntézy GPI kotvy lze rozdělit do tří fází. Nejprve je přenesen GlcNAc z jeho aktivované formy UDP-GlcNAc na molekulu PI. Produktem této reakce je *N*-acetylglukosaminfosfatidylinositol (GlcNAc-PI). Uvedený děj probíhá skrze multiproteinový komplex, který je lokalizovaný v membráně ER. Tento poměrně jednoduchý krok je regulován nejméně šesti geny, u člověka jsou to konkrétně *PIGA*, *PIGC*, *PIGH*, *PIGP*, *PIGQ* a *PIGY* [30]. GlcNAc-PI je následně deacetylován na glukosaminfosfatidylinositol a právě tato molekula je vysoce specifickou složkou GPI kotev. V lidských buňkách je následně GPI na inositolovém konci acylován a je připojena první molekula Man z GDP-Man transportované prostřednictvím Dol-P [29]. V další reakci je stejným mechanismem připojena druhá molekula Man, poté následuje substituce třetí pozice první Man ethanolaminfosfátem, což je regulováno genem *PIGN*. Poté je k řetězci přenosem přes Dol-P připojena další Man pocházející

rovněž z GDP-Man, reakci katalyzuje enzym mannosyltransferasa. V dalším kroku může být připojen druhý EtNP na šestou pozici terminální mannose. Do struktury může být navázána i třetí molekula EtNP, a to na druhou a doposud nesubstituovanou Man [30]. V lidských buňkách a kvasinkách pak ještě někdy další mannosyltransferasa kódovaná genem *PIGZ* katalyzuje připojení čtvrté Man k řetězci [31].



Obrázek 1.3: Základní struktura glykosylfosfatidylinositolové kotvy. Strukturní jádro GPI kotvy obsahuje tři složky. Je tvořeno fosfatidylinositolem, na který je navázán glukosamin (GlcN) a tři mannose (Man). Třetí složkou je ethanolaminofosfát, který zajišťuje navázání proteinové složky. Převzato z [29], upraveno.

Syntetizovaný prekurzor GPI kotvy je poté připraven na přenos na protein. Proteiny, které jsou substráty pro tuto reakci, nesou ve své sekvenci dvě signální peptidové oblasti [30]. První z nich se nachází na aminovém konci bílkoviny a slouží k translokaci přes membránu ER, která je klíčová pro následující procesy biosyntézy GPI kotvy. Druhá signální sekvence je naopak lokalizována na karboxylovém konci

proteinu a je složena ze tří domén. První je tvořena třemi malými aminokyselinami, druhá doména je polární a obvykle obsahuje 5–10 aminokyselin, třetí úsek je typicky hydrofobní a skládá se z 15–20 hydrofobních aminokyselin. V průběhu reakce je signální sekvence odštěpena a nahrazena GPI kotvou za vzniku amidové vazby mezi karboxylovou skupinou proteinu a EtN [29]. Celý tento děj je řízen enzymovým komplexem GPI transamidasou, který je složen z pěti podjednotek (proteiny GPAA1, PIGK, PIGS, PIGT, PIGU) [31].

K dalším modifikacím dochází při transportu GPI-vázaných proteinů z ER skrze GA až do plazmatické membrány. Obvykle dochází k odštěpení acylového zbytku, výjimkou jsou například GPI kotvy izolované z erytrocytů [32, 33]. Stále v ER je rovněž odstraněn EtNP vázaný na druhou Man. Následně jsou GPI proteiny ve formě vezikulů přesouvány přímo do GA, kde jsou rozpoznány specifickými receptory [34]. V GA pak může docházet k nahrazení nesaturovaného acylového řetězce na PI za saturevanou mastnou kyselinu [35]. Tento krok je důležitý pro asociace GPI kotev v lipidové dvojvrstvě membrány. Z dalších úprav lze zmínit vazbu GalNAc do čtvrté pozice první Man, na kterou může být dále připojována Gal a sialová kyselina [36].

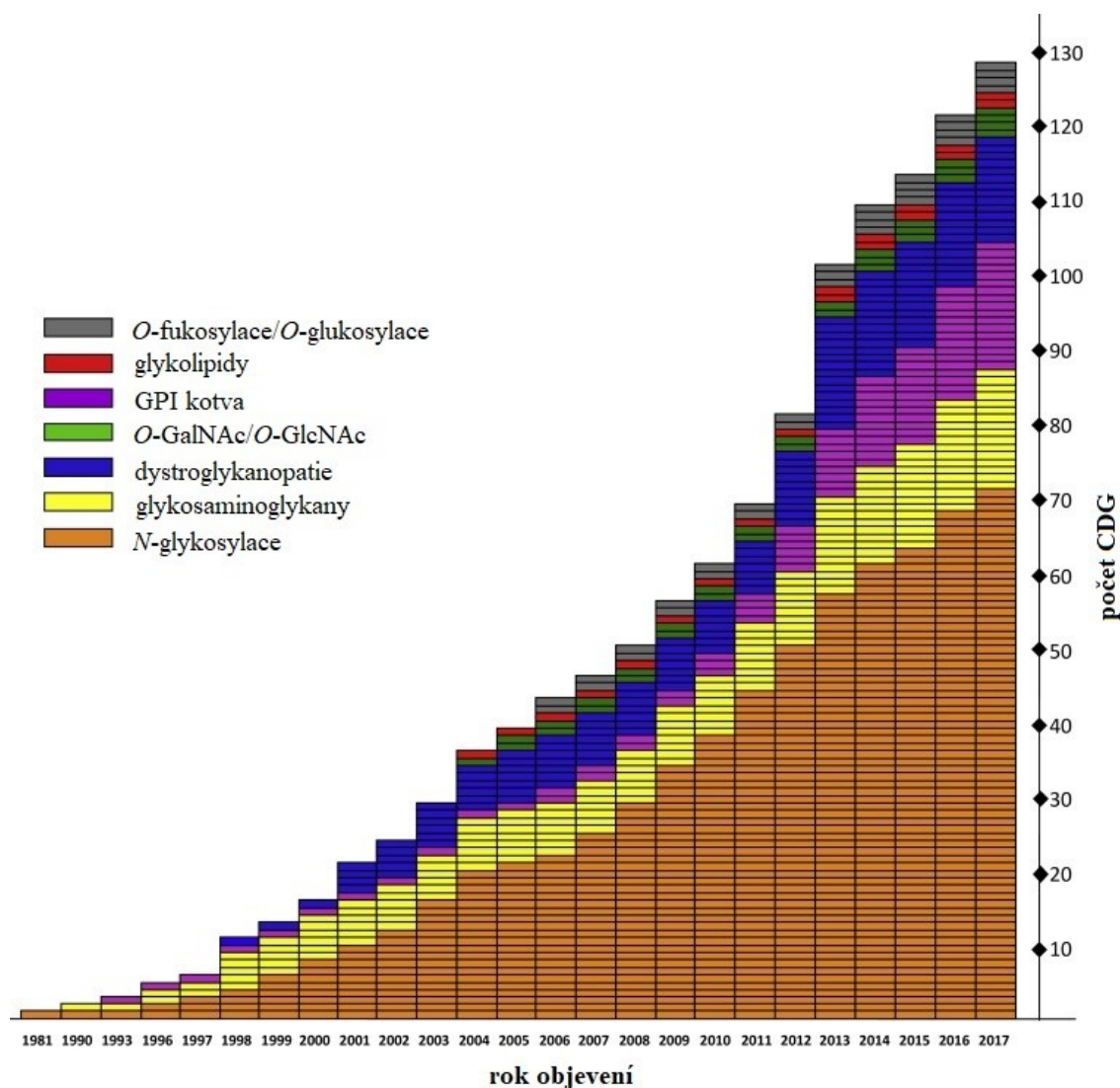
Nejméně 150 lidských proteinů využívá GPI kotvu pro své připojení na buněčné membrány [37]. Mají řadu funkcí, zajišťují komunikaci mezi buňkami a okolním prostředím, jsou to membránové receptory nebo adhezní molekuly. Také regulují chemické procesy, ať už jako hydrolytické enzymy nebo inhibitory proteas [30]. GPI kotvy se mohou u člověka vyskytovat i nevázané na bílkovinu. Funkce volných GPI kotev není známá, naproti tomu bylo zjištěno, že jejich akumulace vede k patologickým změnám v buňce [38].

1.2 Dědičné poruchy glykosylace

Dědičné poruchy glykosylace (CDG, z angl. *congenital disorders of glycosylation*) jsou genetická metabolická onemocnění způsobená defekty v syntéze a úpravě glykoproteinů a glykolipidů. První případ tohoto onemocnění byl popsán v roce 1980 [39]. Od té doby počet nově zaznamenaných CDG každý rok narůstá a doposud bylo definováno 137 typů (Obrázek 1.4, str. 20) [40].

Většina těchto vrozených poruch je autosomálně recesivních, kdy postižený jedinec získá od každého rodiče (přenašeče) mutovanou alelu. V tomto případě je tedy 25% pravděpodobnost, že se onemocnění projeví. Ovšem byly popsány i autosomálně

dominantní formy, formy vázané na chromosom X a některé se mohou objevit i díky mutacím *de novo*. Velmi často je jedná o multisystémové poruchy, které mají celou řadu klinických projevů. Nejběžněji je možné pozorovat opožděný vývoj jedince, neprospívání, hypotonii, neurologické vady, hepatopatii nebo koagulopatii. Pacienti rovněž mohou trpět srdečními, kožními nebo očními vadami a dysmorfismem obličeje [41].



Obrázek 1.4: Nárůst počtu nových typů dědičných poruch glykosylace (CDG). První případ byl popsán v roce 1980, od té doby počet každý rok narůstá, na začátku roku 2021 bylo definováno 137 typů, uvedený graf znázorňuje data k roku 2017. Barevně jsou odlišeny různé skupiny CDG na základě typu glykosylace, která je u daného defektu narušena. Převzato z [42], upraveno.

Jak bylo popsáno výše (kapitola 1.1), glykosylace je poměrně složitý proces s řadou po sobě jdoucích reakcí, jejichž průběh je přísně regulován mnoha enzymy a proteiny. Defekty v genech, které je kódují, jsou příčinou vzniku CDG. Širokou skupinu

CDG můžeme tedy rozdělit podle typu glykosylace, která je mutací genu zasažena. Rozlišujeme poruchy *N*-glykosylace a/nebo *O*-glykosylace proteinů, defekty v modifikaci proteinů pomocí GPI kotvy, defekty glykosylace lipidů a posledním typem jsou poruchy, které zasahují do více glykosylačních drah najednou [40, 41]. Přehled všech dosud charakterizovaných defektů shrnuje Obrázek 1.5, str. 23. Pojmenování jednotlivých syndromů jsou odvozena od označení genu, který je mutací zasažen, s připojením zkratky CDG. V následujících kapitolách budou blíže popsány nejběžnější a některé další vybrané CDG.

1.2.1 Poruchy *N*-glykosylace

Poruchy v *N*-glykosylaci jsou nejpočetnější skupinou CDG, která byla historicky rozdělena do dvou kategorií. První skupina, CDG-I, zahrnuje poruchy, kdy jsou zasaženy kroky spojené se syntézou glykanu na Dol-P, tvorbu prekursoru LLO a přenosem glykanu na nascentní protein. Druhou kategorií jsou CDG-II, které souvisí s následnými úpravami glykanové struktury, která je již napojena na protein, především v GA [10].

Defekt genu pro fosfomannomutasu 2

Defekt genu pro fosfomannomutasu 2 (*PMM2*) byl vůbec prvním charakterizovaným onemocněním v rámci CDG a rovněž je nejčastěji se vyskytující poruchou s více než 900 zaznamenanými případy [43, 44]. Enzym fosfomannomutasa (PMM) katalyzuje přeměnu mannosu-6-fosfátu na mannosu-1-fosfát, což je klíčová reakce pro následné připojení na GDP a vznik aktivované GDP-Man. Tato molekula je zcela zásadní pro syntézu všech *N*-glykanů a rovněž GPI kotev [41, 43]. Existují dvě isoformy tohoto enzymu, *PMM1* a *PMM2*, ale pouze defekt genu *PMM2*, který je uložen na chromosomu 16 v oblasti 16p13, způsobuje hypoglykosylaci vedoucí k syndromu *PMM2*-CDG [45, 46].

V kojeneckém věku se projevuje krátce po narození neurologickými poruchami, patrné jsou problémy spojené s pohybem očí a strabismus, dále se vyskytuje cerebrální hypoplazie, hypotonie, psychomotorická retardace či ataxie. Postižení jedinci často trpí nemocemi jater, problémy s ledvinami a se srdcem. Tento stav může vést k celkovému neprospívání a multiorgánovému selhání, které je příčinou smrti až u 20 % postižených dětí v prvním roce života. U starších jedinců je pak zřejmý opožděný vývoj a intelektuální deficit [43, 47].

1.2.2 Poruchy O-glykosylace

Širokou škálu O-glykoproteinů dělíme podle druhu monosacharidu zprostředkovávajícího vazbu glykanové části na protein, na základě čehož lze klasifikovat i CDG spojené s O-glykosylací. Aktuálně je celkem známo 33 diagnostikovaných CDG spadajících do šesti podskupin (O-glykosylace přes Man, GalNAc, GlcNAc, Glc, Fuc a Xyl) [40].

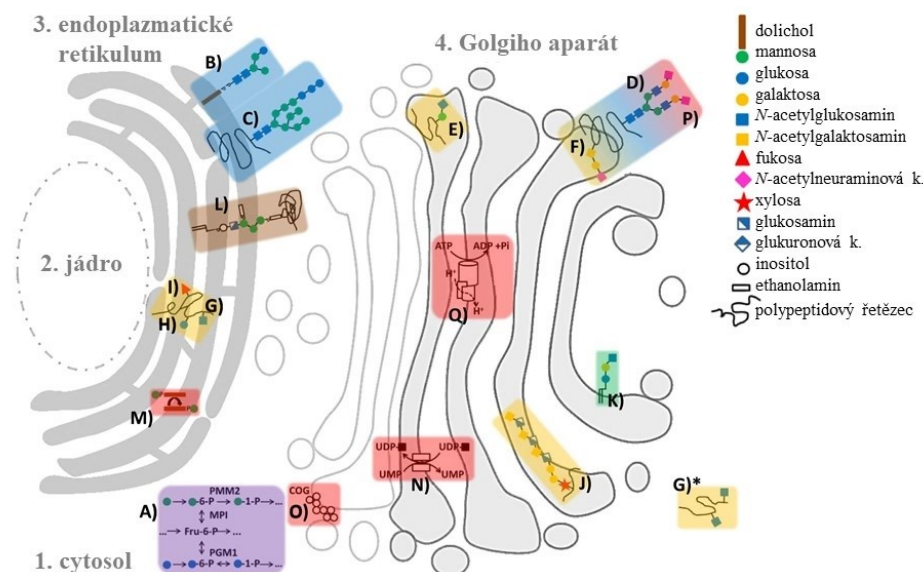
Defekty v syntéze glykosaminoglykanů

Dobře charakterizovány jsou CDG, kdy jsou zasaženy kroky syntézy GAG. Typickým znakem defektů tohoto druhu je postižení kostní a pojivové tkáně. Pacienti společně s neurologickými problémy trpí i kosterní dysplazií, kožními a kloubními potížemi, častými osteosarkomy či chondrosarkomy [41].

Defekty genů *EXT1* a *EXT2* jsou jedny z mála CDG, které mají autosomálně dominantní dědičnost. Enzymy kódované těmito dvěma geny patří do skupiny glykosyltransferas a působí v komplexu v GA, kde regulují polymerizaci heparansulfátu. U pacientů se v mnoha případech vyskytují osteochondromy, což jsou benigní nádory dlouhých kostí. Tyto výrůstky se většinou objeví již při narození a jejich růst postupně zpomaluje, v dospělosti se zastaví úplně. Komplikací může být utlačování periferních nervů a cévního systému [43, 47].

Defekty v O-mannosylaci

Další poměrně početnou skupinu CDG charakterizují defekty v procesu O-mannosylace. Mutace v genu *POMT1*, příp. *POMT2*, způsobuje tzv. syndrom Walker-Warburgové, což je autosomálně recesivní onemocnění. Zasažen je protein O-mannosyltransferasa, který je důležitý pro interakce mezi cytoskeletem a extracelulární matrix v neuronech a svalových buňkách [48]. Poruchy vedou k narušení vývoje mozku, projevují se očními vadami, a především svalovou dystrofií [10]. V naprosté většině případů je POMT1/POMT2-CDG fatální a postižení jedinci umírají v prvním roce života [43]. Podobnými příznaky se projevuje onemocnění POMGNT1-CDG neboli nemoc sval-oko-mozek, které ovšem mívá méně závažný průběh [49].

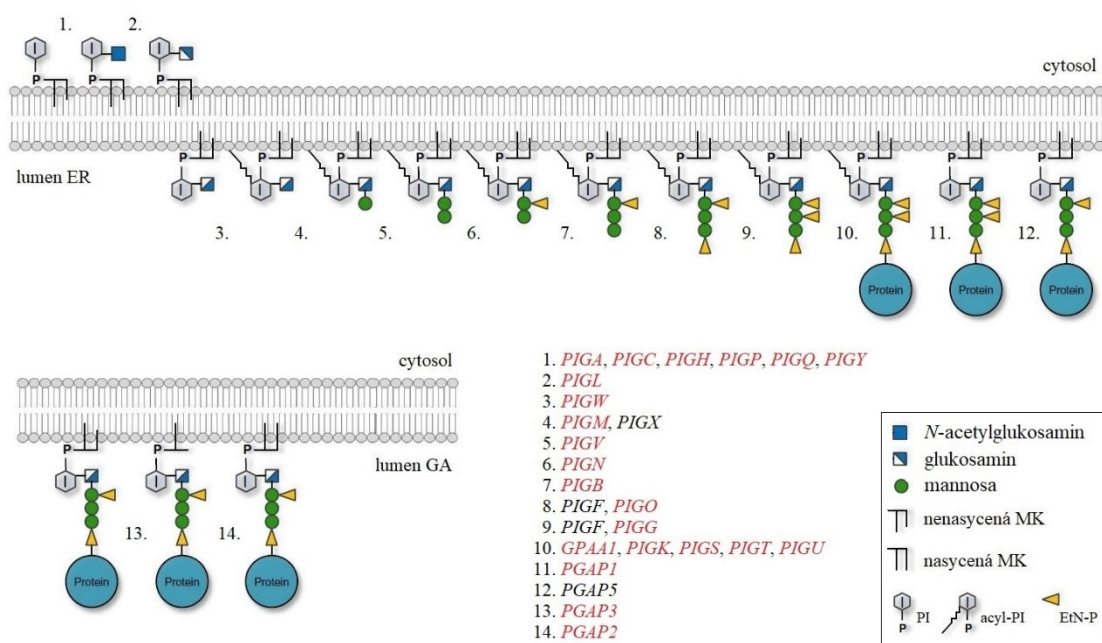


A) syntéza monosacharidů a jejich interkonverze (1.) <i>MAN2B2, MPI, PMM2</i> <i>FCSK, G6PC3, GFPT1, GNE, NANS, PGM1, PGM3</i>	K) glykosylace lipidů (4.) <i>A4GALT, B4GALNT1, ST3GAL5</i>
N-glykosylace B) tvorba LLO (3.) <i>ALG1, ALG2, ALG3, ALG6, ALG8, ALG9, ALG11, ALG12, ALG13, ALG14, DPAGT1, RFT1</i> C) přenos N-glykanu na protein (3.) <i>DDOST, MAGT1, SSR3, SSR4, STT3A, STT3B, TUSC3</i> D) úpravy N-glykanu (3., 4.) <i>FUT8, GANAB, JAGN1, MAN1B1, MGAT2, MOGS, PRKCSH</i>	L) biosyntéza GPI kotvy (3., 4.) <i>GPA1, PGAP1, PGAP2, PGAP3, PIGA, PIGB, PIGC, PIGG, PIGH, PIGK, PIGL, PIGM, PIGN, PIGO, PIGP, PIQO, PIGS, PIGT, PIGU, PIGV, PIGW, PIGY</i>
O-glykosylace E) přes Man (3., 4.) <i>B3GALNT2, B4GAT1, CRPPA, FKRP, FKTN, LARGE1, POMGNT1, POMGNT2, POMK, POMT1, POMT2, RXYLT1</i> F) přes GalNAc (4.) <i>C1GALT1C1, GALNT2, GALNT3</i> G) přes GlcNAc <i>EOGT (3.), OGT (1., 2.)</i> H) přes Glc (3.) <i>POGLUT1</i> I) přes Fuc (3., 4.) <i>B3GALT1, LFNG, POFUT1</i> J) biosyntéza GAG (4.) <i>B3GALT6, B3GAT3, B4GALT7, CANT1, CSGALNACT1, DSE, EXT1, EXT2, EXTL3, CHSY, XYLT1, XYLT2</i>	Další typy CDG M) syntéza dolicholfosfátu (3.) <i>DHDDS, DOLK, DPM1, DPM2, DPM3, MPDU1, NUS1, SRD5A3</i> N) syntéza a transport aktivovaných cukerných donorů (1., 4.) <i>CAD, GMPPA, GMPPB, SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC35C1, SLC35D1</i> O) vezikulární přenosy (4.) <i>COG1, COG2, COG4, COG5, COG6, COG7, COG8, GORAB, GOSR2, SEC23B, TRAPPC11, TRIP11, VPS13B</i> P) glykosyltransferasy (4.) <i>B4GALT1, ST3GAL3</i> Q) Gogi pH a iontová homeostáza (4.) <i>ATP6AP1, ATP6AP2, ATP6V0A2, ATP6V1A, ATP6V1E1, CCDC115, SLC9A7, SLC10A7, SLC39A8, TMEM165, TMEM199, VMA21</i>

Obrázek 1.5: Aktuální přehled všech charakterizovaných CDG. Obrázek schematicky znázorňuje lokalizaci 137 typů CDG definovaných k dnešnímu dni. V poslední době dochází ke značnému nárůstu jejich počtu, počet nově diagnostikovaných CDG stoupl o 17 % za poslední tři roky. Syndromy CDG jsou rozděleny do skupin podle toho, která glykosylační dráha je zasažena. Názvy onemocnění korespondují s označením genu, jehož mutace daný syndrom způsobuje. (Zkratky: ADP – adenosindifosfát; ATP – adenosintrifosfát; COG – konzervovaný oligomerní komplex lokalizovaný v Golgiho aparátu; Fru-6-P – fruktosa-6-fosfát; Fuc – fukosa; GalNAc – N-acetylgalaktosamin; Glc – glukosa; GlcNAc – N-acetylglukosamin; GPI – glykosylfosfatidylinositol; H⁺ – protony; LLO – na lipid vázaný oligosacharid; Man – mannosyl; MPI – fosfomannoisomerasa; PGM1 – fosfoglukomutasa 1; PMM2 – fosfomannomutasa 2; UDP – uridindifosfát; UMP – uridinmonofosfát; Xyl – xylosa.) Převzato z [40], upraveno.

1.2.3 Poruchy syntézy GPI kotvy

Skupinou CDG, u které v posledních letech dochází k nejvýznamnějšímu nárůstu nově popsáných forem, jsou poruchy syntézy GPI kotvy. Jen v minulých třech letech bylo identifikováno dalších sedm genů, jejichž mutace vedou k vrozeným onemocněním. Celkově bylo dosud diagnostikováno 22 různých typů CDG spojených s narušenou modifikací proteinů pomocí GPI [40]. Syntéza GPI kotvy je řízena nejméně 25 geny, které můžeme je rozdělit do dvou kategorií. První kategorií jsou geny *PIG* (z angl. *phosphatidylinositol glycan*), což jsou geny zapojené do tvorby a transferu GPI. Druhou skupinou jsou *PGAP* geny (z angl. *post GPI attachment to proteins*), které souvisí s úpravami a přeměnami GPI po připojení na protein [50]. Obrázek 1.6 znázorňuje doposud popsané defekty v průběhu biosyntézy GPI kotvy.



Obrázek 1.6: Poruchy v syntéze GPI kotvy. Syntéza GPI kotvy probíhá v několika krocích v endoplazmatickém retikulu (ER) a Golgiho aparátu (GA). Každý krok je regulován enzymem nebo enzymy, které jsou kódovány příslušnými geny. Geny, jejichž mutace již byly charakterizovány a vedou k CDG, jsou označeny červeně. (Zkratky: acyl-PI – acylovaný fosfatidylinositol; EtN-P – ethanolaminofosfát; MK – mastná kyselina; PI – fosfatidylinositol.) Převzato z [51], upraveno.

Defekt genu *PIGA*

Prvním popsáným defektem byla mutace v genu *PIGA*, kterým je kódována katalytická podjednotka enzymového komplexu *N*-acetylglukosamintransferasa řídící první krok syntézy GPI kotvy [52]. Gen *PIGA* je lokalizován na chromosomu X. Nemocní jedinci trpí tzv. paroxysmální noční hemoglobinurií (PNH), což je jedna z poruch krvetvorby

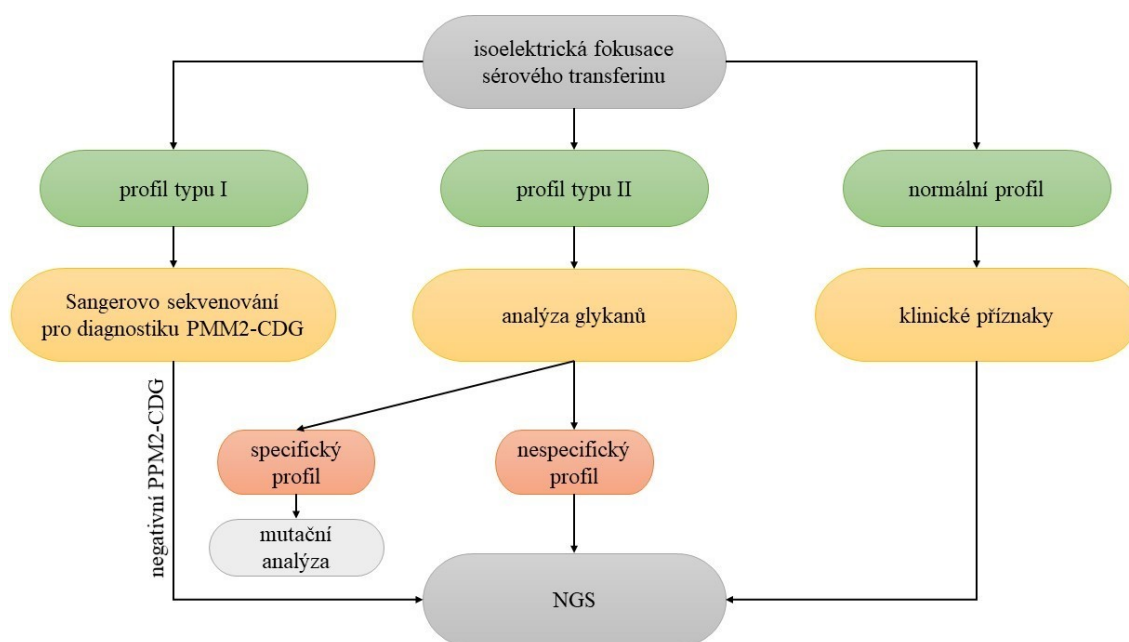
[53]. Jelikož příčinou onemocnění jsou somatické mutace v hematopoetických kmenových buňkách, jsou zasaženy pouze krevní buňky a nikoli buňky zárodečné, tudíž PNH není dědičným onemocněním. Dalšími příznaky jsou celkový opožděný vývoj, poškození nervového systému, dysmorfismus obličeje nebo hypotonie. Existují ovšem i mírnější formy, kdy není přítomný dysmorfismus obličeje a abnormality nervové soustavy. V těchto případech mají pacienti mírnější intelektuální postižení a dožívají se vyššího věku [51].

Defekt genu *PIGN*

Produktem genu *PIGN* je enzym, který řídí připojení molekuly EtNP na první Man v nově syntetizovaném řetězci GPI kotvy v ER [50]. Mutace tohoto genu je spojována s tzv. MCAHS (z angl. *multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome*) [54]. Jedná o autosomálně recesivní onemocnění, stejně je tomu tak u všech známých CDG spojených s poruchou biosyntézy GPI kotvy, s jedinou výjimkou výše zmíněného PIGA defektu [50]. Typickými projevy jsou opět opožděný vývoj, hypotonie, velmi často epilepsie a nejrůznější vrozené vady srdce, močového či trávicího traktu [47]. Druhým onemocněním, které bylo popsáno ve spojitosti s *PIGN* genem, je Frynsův syndrom [55]. Pacienti s tímto syndromem mají vrozené bránicové defekty, typický vzhled obličeje, hypoplazii plic a/nebo nehtů [56]. Nicméně se ukazuje, že jde o geneticky heterogenní onemocnění, jelikož u některých diagnostikovaných případů Frynsova syndromu nebyl gen *PIGN* nijak zasažen [55].

1.3 Diagnostika CDG

Přestože jsou syndromy CDG poměrně vzácnými dědičnými onemocněními, mají téměř vždy velmi těžký průběh a vážné příznaky. I proto se vědci snaží najít metody, které by umožnily včasné odhalení defektu, jeho diagnostiku a zavedení léčby, pokud existuje. Techniky by také mohly pomoci v prenatální diagnostice budoucích rizikových těhotenství u biologicky příbuzných v rodinách se syndromem CDG. Lékařskou diagnostiku komplikuje především široké spektrum klinických příznaků postihující v podstatě všechny orgány a zároveň biochemická heterogenita CDG ztěžuje zavedení použitelných biomarkerů a metod pro stanovení diagnózy [57, 58]. Prozatím neexistuje žádný jednotný „screening“, který by umožnil odhalit všechny subtypy CDG. Diagnóza pacienta je určena z výsledků více biochemických analýz a za použití rozdílných markerů (Obrázek 1.7, str. 26).



Obrázek 1.7: Zjednodušené schéma diagnostiky CDG. Schematicky znázorněný běžný postup diagnostiky při podezření na syndrom CDG pomocí různých biochemických analýz. Ve velké většině případů je konečná diagnóza stanovena pomocí sekvenování, konkrétně tzv. sekvenování nové generace (NGS, z angl. *next-generation sequencing*). Převzato z [47], upraveno.

1.3.1 Biomarkery pro diagnostiku CDG

Transferin

Základním biomarkerem, který se používá při diagnostice poruch *N*-glykosylace je sérový transferin (Tf) [59]. Transferin je glykoprotein se dvěma vazebnými místy pro glykanové řetězce, jehož molekulová hmotnost je 79 kD a jenž je produkován především v játrech a sekretován do plazmy. Jeho funkcí je transport a regulace metabolismu železa v krevní plazmě, kromě toho je také negativním ukazatelem při vzniku zánětů [60]. Původně byl Tf používán jako biomarker pro chronický alkoholismus [61].

Při podezření na CDG se provádí analýza sérového Tf, která určí zastoupení jeho jednotlivých isoform ve vzorku pacienta. U zdravých jedinců převažuje tetrasialotransferin nesoucí na koncích obou antén *N*-glykanové struktury (Obrázek 1.2, str. 15) dva negativně nabitě zbytky kyseliny sialové. Kromě této formy jsou v menší míře zastoupeny i pentasialotransferin a hexasialotransferin. Naproti tomu hyposialované formy se téměř nevyskytují. Změny v relativním zastoupení jednotlivých forem signalizují problém s *N*-glykosylací. Pokles množství tetrasialotransferinu na úkor vyššího zastoupení disialotransferinu a asialotransferinu značí syndrom CDG-I, kde obvykle dochází ke změnám molekulové hmotnosti transferinu (o 2,2–4,4 kDa)

způsobené ztrátou jedné nebo dokonce obou *N*-glykanových antén. U syndromů CDG-II pozorujeme nárůst všech hyposialovaných forem v kombinaci s malými změnami molekulové hmotnosti (řádově ve stovkách Da) [57].

Nevýhodou této metody je schopnost zachytit pouze asi 50 % známých CDG. Analýza sérového Tf je vhodná pouze pro některé poruchy *N*-glykosylace. Nelze ji použít pro poruchy spojené s *O*-glykosylací, syntézou GPI kotvy, glykosylací lipidů, a dokonce ani pro defekty *N*-glykosylace, při kterých nedochází ke změnám v počtu navázaných molekul kyseliny sialové [58].

Další biomarkery pro defekty *N*-glykosylace

Přestože analýza sérového Tf je dominantní metodou při diagnostice poruch *N*-glykosylace, byly nalezeny i další biomarkery, které jsou běžně používány.

Jedním z nich je α_1 -antitrypsin (A1AT), glykoprotein akutní fáze exprimovaný v játrech. Molekula A1AT nese ve své struktuře tři glykosylační místa, proto můžeme rozlišit až osm rozdílných forem A1AT [62]. Obdobně jako u analýzy Tf jsou následně srovnávány glykosylační profily pacientů a zdravých jedinců. Tento biomarker se ukazuje jako vhodný zejména u novorozenců do tří měsíců věku, u kterých nemusí být prozatím dokončen proces syntézy *N*-glykanů vázaných na Tf [63].

Jinými biomarkery jsou haptoglobin a orosomukoid, ale jelikož obsahují vyšší počet glykosylačních míst, nelze jejich formy snadno rozlišit běžně používanými separačními technikami [57]. Studovány byly rovněž glykosylované protilátky třídy IgG v séru. Výhodou těchto molekul by mohlo být, že na rozdíl od ostatních uvedených biomarkerů nepocházejí z jater, a proto jsou jejich glykosylace a koncentrace v séru méně ovlivněny jaterními a zánětlivými onemocněními, které CDG provází [64, 65].

Apolipoprotein C-III

Apolipoprotein C-III (apoC-III) je sérový *O*-glykoprotein a ukázal se jako vhodný biomarker pro kombinované poruchy v *N*- a *O*-glykosylaci a také pro defekty *O*-glykosylace mucinů s jádrem typu 1 [58, 66]. Protein apoC-III je syntetizován v játrech a ve střevě a podílí se na metabolismu lipidů [67]. U zdravých jedinců se apoC-III vyskytuje především ve dvou hlavních formách – substituovaný jednou nebo dvěma sialovými kyselinami. V menším množství je pak přítomna asialovaná forma (méně než 10 %) [57].

Při diagnostice CDG jsou sledovány rozdíly v množství jednotlivých forem apoC-III v porovnání se zdravými kontrolami [68]. Samotná analýza apoC-III se potýká s nižší specifitou, jelikož zastoupení jednotlivých forem může být ovlivněno dalšími faktory jako jsou onemocnění jater nebo obezita [69]. Ovšem v kombinaci se stanovením sérového Tf může velmi dobře fungovat pro odhalení kombinovaných defektů *N*- a *O*-glykosylace, které jsou často spojeny s poruchou homeostázy GA [66].

Další biomarkery pro defekty *O*-glykosylace

Pro defekty v *O*-xylosylaci byl jako nadějný biomarker testován bikunin. Bikunin je proteoglykan ze skupiny GAG exprimovaný v játrech. V lidském organismu se vyskytuje ve dvou formách, inter- α -trypsin inhibitor a pre- α -trypsin inhibitor, obě formy jsou prekurzory inhibitorů serinových proteas [70, 71]. V séru pacientů s mutacemi v genech *B4GALT7*, *B3GALT6*, *B3GAT3* a *CHSY1* byly detekovány neobvyklé isoformy bikuninu, proto se jeví jako slibný marker i pro další CDG [72].

Glykoprotein α -dystroglykan se používá jako biomarker při diagnostice dědičných svalových dystrofií, konkrétně α -dystroglykanopatií. Pomocí jeho analýzy mohou být zachyceny defekty ovlivňující *O*-mannosylaci α -dystroglykanu nebo reakce vedoucí k tvorbě GDP-Man, která je prekurzorem *O*-glykosylačních procesů [73, 74].

Biomarkery pro defekty syntézy GPI kotvy

Pro analýzu správné funkce GPI kotvy se velmi často používá samotný GPI nebo GPI-vázané proteiny (GPI-APs, z angl. *glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins*). Tyto proteiny jsou exprimovány na povrchu buněk a celkem známe více než 150 různých GPI-APs, které je možné izolovat z fibroblastů, granulocytů, erytrocytů a dalších buněčných linií. Mezi nejčastěji používané biomarkery patří CD16, CD24, CD55 a CD59 (zkratkou CD je označována diferenční skupina, z angl. *cluster of differentiation*) [57]. Proteiny CD55 (neboli DAF, z angl. *decay accelerating factor*) a CD59 (neboli MIRL, z angl. *membrane inhibitor of reactive lysis*) jsou jednořetězcové membránově vázané bílkoviny, které se významně podílí na ochraně buněk před poškozením a lyzí řízenou komplementem. Protein CD55 je exprimován především hematopoetickými buňkami, ale i celou řadou dalších buněk. Protein CD59 je pak exprimován buňkami všech tkání v lidském organismu. Tyto dva GPI-APs byly blíže studovány ve spojitosti hemolytickými anémiemi jako je například onemocnění PNH [75].

Další možností je detekce GPI kotvy pomocí fluorescenčně značeného toxinu aerolysinu (FLAER). Proaerolysin je protein produkovaný v bakteriích *Aeromonas hydrophila* s molekulovou hmotností 52 kDa. Aktivovaná forma tohoto proteinu, aerolysin, se specificky váže na GPI kotvu. Aerolysin konjugovaný s fluoroforem (např. Alexa 488) je velmi citlivým markerem změn exprese a funkčnosti GPI kotvy [76]. Zkoumáno bylo taktéž použití monoklonálních protilátek, které zřejmě dokážou rozeznat volné GPI kotvy na povrchu buněk a zdají se být vhodným markerem i pro objasnění defektů při připojování GPI kotev na protein [36].

Alkalická fosfatasa (ALP) je enzym, který se nachází téměř ve všech tkáních těla a ke svému ukotvení v plazmatické membráně rovněž využívá GPI vazbu. Ukazuje se, že u některých typů CDG, které jsou způsobeny defekty v biosyntéze GPI kotvy, lze pozorovat změnu koncentrace ALP v séru. Konkrétně u defektů genů *PIGB*, *PIGO*, *PIGV*, *PGAP2* a *PGAP3* byla zaznamenána zvýšená koncentrace ALP, naproti tomu syndrom PIGT-CDG vykazuje v některých případech snížené hladiny ALP, syndromy PIGC-CDG, PIGG-CDG, PIGH-CDG, PIGK-CDG, PIGM-CDG, PIGS-CDG, PIGU-CDG a GPAA1-CDG pak mají hodnoty ALP normální [57].

1.3.2 Metody pro vyšetření CDG

Běžně používané separační metody

Isoelektrická fokusace (IEF) sérového transferinu byla pro diagnostiku CDG poprvé použita v roce 1984 a od té doby je standardní metodou CDG „screeningu“ [77]. Metoda IEF umožňuje separaci jednotlivých forem Tf na základě jejich náboje v gradientu pH. Jako nosiče jsou běžně používány agarosové nebo polyakrylamidové gely. V případě Tf se pro detekci nejvíce využívá imunofixace v gelu s následným značením pomocí barviva Coomassie-blue. Výhodou IEF je dobré rozlišení, lze přesně separovat všech sedm vyskytujících se forem Tf. Problémem může být časová náročnost a nižší reprodukovatelnost. Analogická technika se používá i pro analýzu forem apoC-III. V tomto případě se separované glykoproteiny přenášejí na nitrocelulosovou membránu a poté jsou imunodetekovány (tzv. metoda Western blot). Nevýhodou je, že IEF neumožňuje rozlišit aglykosylovanou formu od asialoformy, což je molekula glykanu, které chybí pouze terminální kyselina sialová [57].

Další obvykle využívanou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. *high-performance liquid chromatography*). Technika HPLC poskytuje

účinné rozdělení glykoforem Tf v aniontově výměnné koloně. Data získaná při HPLC jsou pak srovnatelná s výsledky poskytovanými IEF, pouze u některých variant Tf HPLC vykazovala nižší rozlišení. Naopak nenáročná příprava vzorků a možnost provést vysoký počet analýz v krátkém čase jsou nespornými přednostmi HPLC [78].

Separace Tf kapilární zónovou elektroforézou zprostředkovává velmi rychlé výsledky s kvalitním rozlišením a kvantifikací jednotlivých forem Tf s výjimkou hexasialotransferinu [57]. Použití této metody pro analýzu apoC-III, a tedy pro charakterizaci *O*-glykosylačních defektů, bylo zavedeno teprve poměrně nedávno [79].

Hmotnostní spektrometrie nabízí velmi citlivé a komplexní stanovení jak glykoproteinů, tak i glykosylačních míst a oligosacharidových struktur. Díky svému kvalitnímu rozlišení je velmi přínosnou metodou v diagnostice *N*-glykosylačních i *O*-glykosylačních defektů. V kombinaci s vhodnou separační metodou získáme nejenom informace o přesném složení daného glykoproteinu, ale i o místech větvení a stereochemii molekuly [57].

Využití celoexomového sekvenování

Ačkoli výše uvedené metody napomáhají při určení typu CDG, diagnostika těchto syndromů se nadále potýká s několika problémy. Jedním z nich je ohromná fenotypová variabilita mezi různými CDG, ale i v rámci každého z nich. To společně s už tak vysokým počtem definovaných CDG komplikuje rozpoznání defektu a určení mutovaného genu.

Průlom v diagnostice a celkové charakterizaci syndromů CDG nastal s rozvojem a rozšířením nových technik sekvenování, konkrétně technik sekvenování nové generace (NGS, z angl. *next-generation sequencing*). V roce 2010 se poprvé podařilo přiřadit genetické onemocnění ke konkrétnímu genu prostřednictvím celoexomového sekvenování (WES, z angl. *whole exome sequencing*). Tato metoda je jednou z technik NGS a specificky se zaměřuje na protein-kódující oblasti, tzv. exony. Krátce po zavedení WES v diagnostice dědičných onemocnění byl touto metodou vyřešen i první případ syndromu CDG, jednalo se o PIGV-CDG. Od té doby WES pomohlo objasnit genetickou příčinu mnoha syndromů CDG, byly objeveny mutace dalších genů způsobující poruchy glykosylace a rovněž byla prokázána řada mutací *de novo* vedoucí k novým formám CDG [42].

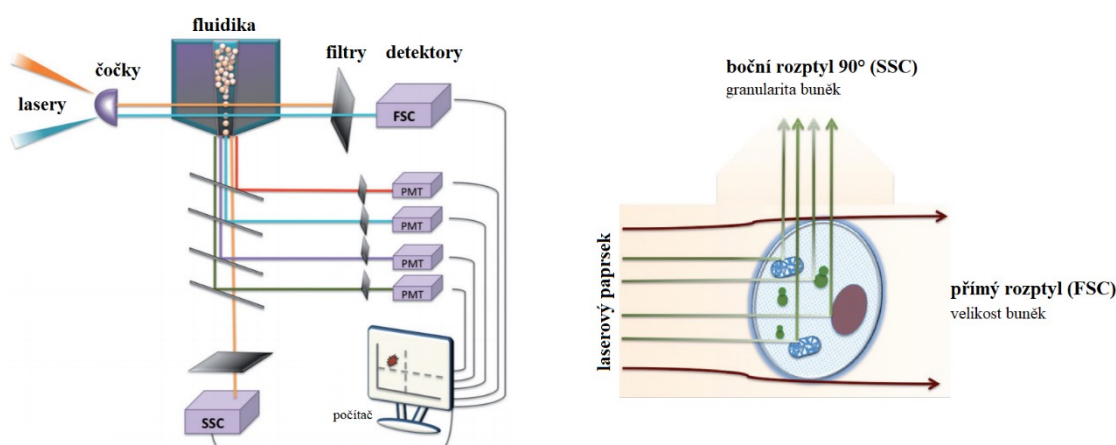
Velkou výhodou WES je sekvenování všech genů v jednom kroku, čímž se výrazně zvýší rychlost a sníží finanční náklady pro diagnostiku každého pacienta v porovnání se sekvenováním jednotlivých genů. Rychlost nasazení léčby nebo podpůrné terapie je při syndromech CDG klíčová a může výrazně ovlivnit kvalitu života nemocného jedince [80]. Technika WES je přínosem především pro diagnostiku pacientů, u kterých nebyly zachyceny žádné změny specifických markerů. Ve velké míře proto nachází uplatnění při odhalování příčin syndromů typu CDG-II [47].

1.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FACS, z angl. *fluorescence activated cell sorting*) je velmi rozšířenou metodou v buněčné biologii. Používá se k charakterizaci buněk, k určení jejich počtu, jejich velikosti a objemu [81]. Technika FACS byla zavedena v 60. letech minulého století Leonardem Herzenbergem. Původní průtoková cytometrie umožňovala pouze stanovení velikosti analyzovaných buněk. Dnešní průtokové cytometry jsou schopny sledovat až 14 různých parametrů zároveň.

Základním principem této metody je ozařování buněk monochromatickým zářením a následná detekce záření rozptýleného. Proces měření je možné rozdělit do tří fází spojených se třemi hlavními součástmi průtokového cytometru. Nejprve jsou buňky z analyzovaného vzorku pomocí trysky nasáty do kapalinového systému průtokového cytometru. Důležitou podmínkou správného měření je, aby se buňky nacházely v suspenzi a aby protékaly cytometrem jednotlivě jedna po druhé, což je zajišťováno právě fluidikou průtokového cytometru. Analyzované buňky jsou vstříkovány do tzv. nosné kapaliny laminárně proudící v průtokové cele. Nedochází ke smísení těchto dvou tekutin, ale vytvoří se tzv. koaxiální proud. Následná hydrodynamická fokusace, která je regulována rozdílem tlaku vzorku a tlaku nosné kapaliny, řídí průchod jednotlivých buněk skrze měřicí bod. Optika průtokového cytometru se skládá ze zdroje excitačního záření, čoček a několika detektorů. Zdrojem je ve většině případů laserový paprsek, který poskytuje monochromatické koherentní záření s vysokou energií. Čočky pak tento paprsek usměrňují a zaostřují na proud analyzovaných buněk. Detektory zachycují rozptýlené záření vznikající na osvětčovaných buňkách, a to jak přímý rozptyl (FSC, z angl. *forward angle scatter*) ve směru laserového paprsku, tak i boční rozptyl (SSC, z angl. *side angle scatter*) pod úhlem 90°. Intenzita FSC poskytuje informace o velikosti a členitosti povrchu buněk, zatímco intenzita SSC je úměrná granularitě a vnitřnímu stavu buňky. Pro detekci fluorescence jsou používány speciální filtry

propouštějící buď všechny vlnové délky vyšší než specifikovaná vlnová délka (LP, z angl. *long pass*) nebo všechny vlnové délky kratší než specifikovaná vlnová délka (SP, z angl. *short pass*) anebo specifické rozmezí vlnových délek (BP, z angl. *band pass*). U průtokové cytometrie rozlišujeme dva hlavní druhy detektorů – fotodiody obvykle používané pro snímání FSC a fotonásobiče (PMT, z angl. *photomultiplier tubes*) s vyšší citlivostí pro zachycení SSC a fluorescence. Fotodetektory převádí zachycené světelné signály nejprve na elektrický proud, který je v zesilovači přeměněn v napěťový pulz. Výsledkem je analogový signál, který je dále převeden na signál digitální a poté je zaznamenán ve formě mnohorozměrných grafů a histogramů. Schéma průtokového cytometru zachycuje Obrázek 1.8.



Obrázek 1.8: Složení průtokového cytometru. Levá část obrázku schematicky znázorňuje nejdůležitější části průtokového cytometru. Fluidika průtokového cytometru nasává buněčnou suspenzi z analyzovaného vzorku za vzniku koaxiálního proudu. V něm jsou jednotlivé buňky osvětlovány laserovými paprsky, které jsou usměrňovány čočkami optického systému. Rozptýlené záření prochází skrze filtry a je zaznamenáváno pomocí detektorů, z nichž se signál přenáší do počítačových softwarů. Rozlišujeme detektory přímého rozptylu (FSC) a bočního rozptylu (SSC), fluorescence je pak velmi často zachycována pomocí fotonásobičů (PMT). Intenzita FSC poskytuje informace o velikosti a povrchu buněk a intenzita SSC odpovídá granularitě buněk, což je znázorněno v pravé části obrázku. Převzato z [82], upraveno.

Pro měření fluorescence se ve většině případů využívá značení buněk fluorescentními sondami (zkráceně fluorofory). Absorpční spektrum fluoroforu udává, v jaké oblasti může být excitován, zatímco emisní spektrum je tvořeno vlnovými délkami, které fluorofor emituje při přechodu zpět do neexcitovaného stavu. Rozdíl vzdáleností mezi maximy vlnových délek absorpčního a emisního pásu je označován jako Stokesův posun a udává kvalitu separace excitovaného a emitovaného světla. Obecně je měření fluorescence průtokovou cytometrií velmi citlivou technikou a umožňuje detekci

obrovského množství buněk ve velmi krátkém čase. Další výhodou je, že nedochází k destrukci analyzovaného vzorku a je možné použít ho pro další měření [82, 83].

1.5 Fluorescenční mikroskopie

Technika fluorescenční mikroskopie (FM) je používána ke sledování vnitřní struktury buněk, jejich složení a dynamiky. První experimenty spojené se sledováním fluorescenčního záření byly provedeny již na počátku 20. století. Buňky byly osvětlovány ultrafialovým zářením a světelný signál byl pozorován pomocí klasického mikroskopu, který brzy nahradil primitivní fluorescenční mikroskop poprvé sestrojený v roce 1911. Od té doby se fluorescenční mikroskopie velmi výrazně rozvinula, zaprvé s rozšířením používání značených protilátek a fluorescenčních sond, zadruhé s vývojem optických systémů pro fluorescenční mikroskopy, a dnes patří k základním metodám biologického výzkumu [84].

Technikou FM lze pozorovat primární fluorescenci (tzv. autofluorescence) či sekundární fluorescenci. Autofluorescence je přirozená fluorescence buněk, která ovšem nemívá příliš vysokou intenzitu. Pozorovat ji lze například díky cytochromům, hemoglobinu či myoglobinu [85]. Ačkoli autofluorescenci vykazuje jen malé množství buněčných složek, vlastnosti buněk mohou být zachycovány díky specifickému značení vybraných makromolekul či kompartmentů, což je označováno jako sekundární fluorescence. Princip tohoto značení spočívá v použití vhodných fluorescenčních značek, které jsou excitovány zářením a emitované světlo fluoroforu je následně zachyceno detektory. Stejně jako u FACS jsou značené vzorky osvětlovány zářením s vysokou intenzitou, čímž dojde k excitaci navázaných fluorescenčních sond. Následně dojde k emitování světla s nižší energií fluoroforem, obvykle s vlnovou délkou ve viditelné oblasti. Poté je díky optickým filtrům fluorescenčního mikroskopu, které blokují světlo nežádoucích vlnových délek, snímáno emitované záření fluoroforu. Objektivy a clony mikroskopu usměrňují fluorescenční záření tak, aby nedocházelo k jeho výrazným ztrátám. Výsledkem je dvourozměrný obraz fluorescenčně značených struktur na černém pozadí. Dnes je již dostupná velmi široká škála fluoroforů lišící se vlnovými délkami absorbovaného a vyzářeného světla a jeho intenzitou. Rovněž existuje řada značek, které nijak nepoškozují značené buňky a lze je použít pro sledování dynamiky buněčných procesů [86, 87].

2 Cíle práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zavedení nových biochemických analýz pro usnadnění záchytu a potvrzení diagnózy u CDG suspektních pacientů a pro charakterizaci nově definovaných glykosylačních poruch na buněčné úrovni. Pro dosažení tohoto cíle bylo důležité splnit následující dílčí úkoly:

- s využitím průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie
 - optimalizovat a aplikovat stanovení sializace v kultivovaných fibroblastech zdravých kontrol a pacientů s CDG pomocí fluorescenčně značeného SNA lektinu,
 - stanovit expresi vybraných specifických fluorescenčně značených markerů GPI kotvy (FLAER, CD55, CD59) v kultivovaných fibroblastech zdravých kontrol a pacientů s CDG,
 - studovat změny mitochondriálního membránového potenciálu spojené s onemocněními CDG s využitím fluorescenčně značené sondy JC-1,
- porovnat metody průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie a zhodnotit jejich využití pro diagnostiku a charakterizaci pacientů s CDG.

3 Materiál a metody

3.1 Použitý biologický materiál

Veškeré experimenty byly prováděny na lidských fibroblastech získaných při kožní biopsii. Bylo použito celkem pět linií fibroblastů získaných od pacientů (P1–P5) po informovaném souhlasu v rámci diagnostického programu Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. V Tabulce 3.2 (str. 36) jsou uvedeny diagnostikované CDG syndromy společně s konkrétními mutacemi zasažených genů a rovněž klinické příznaky jednotlivých pacientů. Kontrolními buňkami pak byly komerčně dostupné linie fibroblastů K1 od společnosti Lonza (Švýcarsko), linie K2 a K3 od organizace American Type Culture Collection (USA) a linie K4 a K5 získané po informovaném souhlasu od jedinců, u kterých nebylo prokázáno CDG onemocnění, v rámci projektu MZ ČR AZV 16–31932A pro Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch (Tabulka 3.1).

Všechny buněčné linie byly pro experimenty kultivovány stejným způsobem za totožných podmínek tak, jak je uvedeno níže v kapitole 3.5.1. Pro jednotlivá měření byly používány kontrolní fibroblasty v rozmezí pasáží 8–12, fibroblasty pacientů byly v rozmezí pasáží 6–11.

Tabulka 3.1: Kontrolní linie kožních fibroblastů. Přehled použitých kontrolních fibroblastů zahrnující informace o pohlaví jedinců a jejich věku v době odběru kožních buněk.

Označení	Pohlaví	Věk v době biopsie
K1	muž	novorozenec, < 1 měsíc
K2	žena	novorozenec, < 1 měsíc
K3	muž	kojenec, < 1 rok
K4	žena	dospělý, 28 let
K5	muž	dospělý, 36 let

Tabulka 3.2: *Linie kožních fibroblastů pacientů*. Přehled použitých fibroblastů od pacientů diagnostikovaných s CDG zahrnující informace o typu onemocnění a konkrétní mutaci genu, o výsledku běžného „screeningu“ , o pohlaví jedinců a jejich věku v době odběru kožních buněk a o významných klinických symptomech.

Označení	Typ onemocnění	Mutace genu Zasažený enzym	Výsledek „screeningu“ (IEF sérového transferinu)	Pohlaví	Věk v době biopsie	Klinické projevy
P1	PIGN-CDG	c.[935T>G];[1575-1G>A] transferasa GPI-ethanolaminofosfátu 1	negativní	žena	5 let	opožděný vývoj a puberta, plicní stenóza, epilepsie, snížený intelekt
P2	deficit PISD	c.[259C>T];[259C>T] dekarboxylasa fosfatidylserinu	negativní	muž	19 let	porucha růstu (nanismus), skeletální dysplazie, skolióza páteře, bilaterální katarakta (transplantace čoček), výkyvy v chování, občasná agresivita
P3	ATP6AP1-CDG	c.[221T>C];[0] protonová ATPasa typu V podjednotka S1	kombinovaný defekt N- a O-glykosylace	muž	3 měsíce	rychle progresující jaterní selhání, splenomegalie, koagulopatie, postižení kůže (<i>cutis laxa</i>)
P4	SLC10A7-CDG	c.[335G>A]; c.[722-16A>G] kotransportér sodík/žlučová kyselina 7	kombinovaný defekt N- a O-glykosylace	muž	34 let	nanismus, kostní dysplazie, skolióza páteře, poruchy vývoje chrupu (<i>amelogenesis imperfecta</i>), strabismus, nedoslýchavost, podprůměrný intelekt
P5	SLC10A7-CDG	c.[335G>A]; c.[722-16A>G] kotransportér sodík/žlučová kyselina 7	kombinovaný defekt N- a O-glykosylace	žena	37 let	nanismus, kostní dysplazie, poruchy vývoje chrupu (<i>amelogenesis imperfecta</i>), nedoslýchavost

3.2 Použité chemikálie

3.2.1 Čisté chemikálie a komerčně dodávané roztoky

ATB	antibiotický a antimykotický roztok „Antibiotic-Antimycotic 100X“ (100x konc.; streptomycin sulfát, penicilin G sodný) Biosera (Francie)
CD55	fluorescenčně značená protilátka Anti-Hu CD55 PE EXBIO (Česká republika)
CD59	fluorescenčně značená protilátka Anti-Hu CD59 Alexa Fluor EXBIO (Česká republika)
DMEM	kultivační médium (4,5 g/l D-glukosa, 3,7 g/l NaHCO ₃ , L-glutamin, pyruvát sodný) PAN-Biotech GmbH (Německo)
DMSO	dimethylsulfoxid Sigma-Aldrich (USA)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina Sigma-Aldrich (USA)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. <i>fetal bovine serum</i>) PAN-Biotech GmbH (Německo)
FCCP	karbonylkyanid- <i>p</i> -trifluormethoxyfenylhydrazon Sigma-Aldrich (USA)
FLAER	FLAER: Alexa Fluor 488 proaerolysin (zásobní koncentrace 1 µM) Cedarlane Laboratories (Kanada)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina Sigma-Aldrich (USA)
JC-1	sonda mitochondriálního membránového potenciálu (zásobní koncentrace 7,7 mM) Molecular Probes (USA)

Neu	neuraminidasa Roche (Švýcarsko)
PBS	fosfátový pufr (10x konc.; 90,000 mg/l NaCl, 7,950 mg/l Na ₂ HPO ₄ , 1,440 mg/l KH ₂ PO ₄) Lonza (Švýcarsko)
PFA	paraformaldehyd Thermo Fisher Scientific (USA)
SNA	fluorescenčně značený <i>Sambucus Nigra</i> lektin (zásobní koncentrace 2 mg/ml) Vector Laboratories (USA)
T + E	roztok trypsinu „Trypsin-EDTA 10X“ (10x konc.; 0,5% (w/v) trypsin, 0,2% (w/v) EDTA v roztoku PBS) Biosera (Francie)

3.2.2 Roztoky připravené v laboratoři

FACS pufr	2% (v/v) inaktivované fetální hovězí sérum (iFBS) v PBS 2 mM HEPES 2 mM EDTA
Promývací pufr	1% (v/v) iFBS/PBS

3.3 Použité přístroje

Automatické pipety a mikropipety

Eppendorf (Německo)
Gilson (USA)

Centrifugy

Universal 32R, Hettich Zentrifugen (Německo) s úhlovým rotorem
Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen (Německo) s výkyvným rotorem
minicentrifuga ROTILABO, Carl Roth (Německo)

Digitální kamera

ORCA-Flash2.8, Hamamatsu Photonics (Japonsko)

Chladicí a mrazicí boxy

Liebherr (Švýcarsko), Zanussi (Itálie), Sanyo (Japonsko)

Inkubátory

Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo (Japonsko)

Heratherm IMC18, Thermo Fisher Scientific (USA)

TCH100, Laboratorní přístroje Praha (Česká republika)

Laboratorní třepačka

MS 3 basic, IKA (Německo)

Laminární box

Clean Air, Schoeller (Česká republika)

Magnetická míchačka

MM2A, Laboratorní přístroje Praha (Česká republika)

Mikroskop

Eclipse Ti2-U, Nikon (Japonsko)

Odsávací systém

BVC control, Vacuubrand (Německo)

Pipetovací nástavec

Pipetus, Hirschmann (Německo)

Počítací pipeta

Scepter Handheld Cell Counter, Millipore (USA)

Průtokový cytometr

BD FACSCanto II, BD Biosciences (USA)

Předvážky

Kern 440-35A, Kern & Sohn (Německo)

3.4 Použité počítačové programy

BD FACSDiva software 6.1.3, BD Biosciences (USA)

Fiji (ImageJ) [88], LOCI University of Wisconsin (USA)

NIS-Elements BR Analysis 5.11.00, Nikon (Japonsko)

3.5 Použité metody

3.5.1 Kultivace fibroblastů

Rozmrazování buněk

Zkumavky se zamrazenou buněčnou suspenzí uchovávané v kapalném dusíku byly rozmrazeny pod proudem vlažné vody a následně byl jejich obsah v laminárním boxu přenesen pipetou do 25cm² láhve, která obsahovala 4 ml DMEM média předem vyhřátého na 37 °C s 10% (v/v) FBS a 1% (w/v) ATB. Buňky byly dále kultivovány v inkubátoru (Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo) při 37 °C a v 5% CO₂. Zhruba po 6 hodinách, během kterých se buňky adherovaly na povrch láhve, bylo odsáto původní médium a byly přidány 4 ml čerstvého vyhřátého DMEM média.

Pasážování buněk

Při dosažení 80–90% konfluence (zhruba každé 4 dny) byly buňky pasážovány. Z láhve s buňkami bylo odsáto médium, následně byly buňky opláchnuty 2x malým množstvím PBS: přibližně 2 ml do 25cm² láhve a 5 ml do 75cm² láhve. Poté bylo přidáno 500 µl roztoku T + E na 25cm² láhev, 1,5 ml na 75cm² láhev. Buňky byly s tímto roztokem inkubovány 5 minut při 37 °C (Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo) a následně byly pomocí pipety rozsuspendovány v 5 ml vyhřátého DMEM média. Polovina obsahu láhve byla přenesena do láhve nové a obě láhve byly doplněny médiem: 25cm² láhev na 4 ml a 75cm² láhev na 10 ml. Buňky po pasáži byly opět kultivovány v inkubátoru (Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo) při 37 °C a v 5% CO₂.

Zamrazování buněk

Z láhve s buňkami bylo odsáto médium, následně byly buňky opláchnuty 2x malým množstvím PBS: přibližně 2 ml do 25cm² láhve a 5 ml do 75cm² láhve. Poté bylo přidáno 500 µl roztoku T + E na 25cm² láhev, 1,5 ml na 75cm² láhev. Buňky byly s tímto roztokem inkubovány 5 minut při 37 °C (Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo) a následně byly pomocí pipety rozsuspendovány v 5 ml vyhřátého DMEM média. Tato suspenze byla přenesena do 15ml kónické zkumavky a centrifugována (Universal 32R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota). Supernatant byl odsát a peleta byla rozsuspendována v 1,5 ml DMEM média s 10% DMSO pro 25cm² láhev, ve 4,5 ml pro 75cm² láhev. Tento roztok buněk byl rozdělen po 1,5 ml do zmrazovacích zkumavek. Zkumavky byly uloženy ve speciálních kontejnerech, které zajistily postupné a šetrné

zmrazování buněčné suspenze, přes noc v mrazáku při -80°C . Druhý den byly zkumavky přeneseny kapalného dusíku, kde byly dále uchovávány.

3.5.2 Průtoková cytometrie

Pro všechny experimenty analyzované průtokovým cytometrem byly fibroblasty sledovaných buněčných linií pěstovány v 75cm^2 láhvích do 90–100% konfluence. Následně byly v laminárním boxu opláchnuty 2x přibližně 5 ml PBS a inkubovány s 1,5 ml roztoku T + E po dobu 5 minut při 37°C .

Optimalizace analýzy sializace pomocí SNA lektinu

Pro stanovení množství kyseliny sialové v glykoproteinech zdravých kontrol a pacientů diagnostikovaných s CDG bylo využito značení SNA lektinem. Tento lektin, pocházející z kůry bezu černého, se specificky váže na kyselinu sialovou připojenou na terminální galaktosu vazbou α -2,6, v menší míře pak vazbou α -2,3. Obě tyto vazby se vyskytují v anténách komplexních či hybridních *N*-glykanů, které mohou být pozměněny nebo poškozeny při defektech CDG.

Po trypsinizaci bylo již nesterilně přidáno 3,5 ml 10% (v/v) iFBS/PBS na 75cm^2 láhev, buňky byly rozsuspendovány pipetou a jejich množství bylo stanoveno pomocí počítačích pipety (Scepter Handheld Cell Counter, Millipore). Buněčná suspenze byla rozdělena do 7 kónických zkumavek tak, aby v každé zkumavce bylo přibližně 400 000 buněk. Vzorky byly centrifugovány na centrifuze (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota).

Následně byl odsát supernatant a buňky byly fixovány 500 μl 4% (v/v) PFA/PBS po dobu 20 minut za laboratorní teploty. Pak byly přidány 3 ml promývacího pufru, vzorek byl zamíchán na laboratorní třepačce a opět centrifugován (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota). Supernatant byl odsát, k negativním kontrolám (4 zkumavky) bylo přidáno 200 μl promývacího pufru a k pozitivním kontrolám (3 zkumavky) bylo přidáno 200 μl roztoku promývacího pufru s neuraminidasou (200 $\mu\text{U/ml}$). Takto byly vzorky inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly přidány 3 ml promývacího pufru, vzorek byl jemně zamíchán na třepačce a centrifugován (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), supernatant byl odsát.

Od následujícího kroku byly vzorky uchovávány ve tmě a na ledu. Byly připraveny roztoky SNA lektinu v promývacím pufru o výsledných koncentracích 5 µg/ml, 10 µg/ml a 20 µg/ml. Tyto roztoky byly po 500 µl přidány k připraveným vzorkům, každá koncentrace roztoku SNA lektinu vždy k pozitivní i negativní kontrole. Do slepého vzorku bylo přidáno 500 µl promývacího pufru. Vzorky byly inkubovány na ledě 1 hodinu. Poté byly přidány 3 ml promývacího pufru, vzorky byly jemně zamíchány na třepačce a centrifugovány (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), supernatant byl odsát. Pelety byly rozsuspendovány v 500 µl promývacího pufru a analyzovány na průtokovém cytometru (BD FACSCanto, BD Biosciences) v programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Přesné parametry pro nastavení průtokového cytometru jsou uvedeny v Obrázku 3.1.

Parameters	Type	Voltage	Log
FSC	A, H, W	180	Off
SSC	A, H, W	300	Off
BE4*530/30*FITC	A, H	320	On
BD3*585/42*PE	A, H	300	On
BB2*670/LP*PerCP	A, H	484	On
BA1*780/60*PE-Cy7	A, H	450	On
RC7*660/20*APC	A, H	400	On
RA6*780/60*APC-C...	A, H	431	On
VB8*450/50*Pacific...	A, H	280	On
VA9*510/50*AmCya...	A, H	308	On

Threshold Operator:	OR
Threshold Parameters	Threshold
FSC	20,000

Obrázek 3.1: Nastavení průtokového cytometru pro analýzu fibroblastů značených SNA lektinem. Přesné parametry nastavení průtokového cytometru BD FACSCanto (BD Biosciences) použité při analýze sializace buněk značených SNA lektinem. Výsledky byly získány prostřednictvím programu BD FACSDiva (BD Biosciences) ve spolupráci s doc. MUDr. Janem Živným, PhD. a Ing. Martinem Báječným z Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK.

Analýza sializace pomocí SNA lektinu

Po 5 minutách trypsinizace bylo přidáno 3,5 ml 10% (v/v) iFBS/PBS na 75cm² láhev, ve kterém byly buňky rozsuspendovány. Následně bylo určeno množství fibroblastů v láhvi pomocí počítací pipety (Scepter Handheld Cell Counter, Millipore) a obsah láhve byl rozdělen do kónických zkumavek tak, aby v každé zkumavce bylo přibližně 400 000 buněk. Od každé buněčné linie byly měřeny 2 vzorky. Navíc byl připraven 1 vzorek s roztokem neuraminidasy, která odštěpuje terminální kyselinu sialovou, jako pozitivní kontrola pro ověření metody.

Buňky ve zkumavkách byly centrifugovány (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), poté byl odsát supernatant, peleta byla rozsuspendována v 500 μ l 4% (v/v) PFA/PBS a takto byl vzorek inkubován 20 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly přidány 3 ml promývacího pufru, vzorek byl promíchán na třepačce a centrifugován (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota). Následně byl odebrán supernatant, do vzorku pro kontrolu metody bylo přidáno 200 μ l roztoku promývacího pufru s neuraminidasou (200 μ U/ml) a do ostatních vzorků bylo přidáno 200 μ l promývacího pufru. Takto byly vzorky inkubovány po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Ke všem vzorkům byly opět přidány 3 ml promývacího pufru, vzorky byly promíchány a centrifugovány (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), supernatant byl odsát.

Od následujícího kroku byly vzorky uchovávány ve tmě a na ledu. Do prvního vzorku z každé buněčné linie bylo přidáno 500 μ l roztoku promývacího pufru se SNA lektinem (10 μ g/ml), do druhého vzorku bylo přidáno pouze 500 μ l promývacího pufru. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu na ledu chráněné před světlem. Ke všem vzorkům byly opět přidány 3 ml promývacího pufru, vzorky byly promíchány a centrifugovány (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), supernatant byl odsát. Peleta byla rozsuspendována v 500 μ l promývacího pufru a uchovávána na ledu ve tmě až do analýzy pomocí průtokového cytometru (BD FACSCanto, BD Biosciences) v programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Přesné parametry pro nastavení průtokového cytometru jsou uvedeny v Obrázku 3.1 (str. 42).

Analýza defektů GPI kotvy pomocí specifických markerů

Marker FLAER se běžně používá při diagnostice glykosylačních defektů, například paroxysmální noční hemoglobinurie, jelikož se specificky váže přímo na GPI kotvu v buněčné membráně. Rovněž se využívají protilátky proti proteinům CD55 a CD59, což jsou GPI-vázané proteiny, jejichž exprese je často sledována ve spojitosti s těmito onemocněními [89].

Po trypsinizaci fibroblastů bylo přidáno 3,5 ml FACS roztoku, ve kterém byly buňky rozsuspendovány a následně bylo jejich množství spočítáno pomocí počítací pipety (Scepter Handheld Cell Counter, Millipore). Roztok s buňkami byl následně rozdělen do kónických zkumavek tak, aby v každé zkumavce byl zhruba 1 milion buněk. Od první kontrolní linie bylo připraveno celkem 5 vzorků, od všech ostatních buněčných linií byly

připraveny 3 vzorky. Vzorky byly centrifugovány na centrifuze (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota). Supernatant byl odsát.

Od následujícího kroku probíhal experiment ve tmě. K peletám buněk bylo přidáno vždy 100 µl značícího roztoku příslušného markeru, případně 100 µl čistého FACS roztoku k negativním kontrolám. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v Tabulce 3.3 (str. 45). Buňky byly rozsuspendovány a vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě za laboratorní teploty. Poté bylo přidáno 500 µl FACS roztoku, vzorky byly promíchány a centrifugovány (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), supernatant byl odsát. Tento krok byl opakován ještě jednou a následně byla peleta rozsuspendována v 500 µl FACS roztoku. Takto byly vzorky uchovávány ve tmě až do analýzy pomocí průtokového cytometru (BD FACSCanto, BD Biosciences) v programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Přesné parametry pro nastavení průtokového cytometru jsou uvedeny v Obrázku 3.2.

Parameters	Type	Voltage	Log
FSC	A, H, W	270	Off
SSC	A, H, W	330	Off
BE4*530/30*FITC	A, H	450	On
BD3*585/42*PE	A, H	400	On
BB2*670/LP*PerCP	A, H	484	On
BA1*780/60*PE-Cy7	A, H	450	On
RC7*660/20*APC	A, H	350	On
RA6*780/60*APC-C...	A, H	431	On
VB8*450/50*Pacific...	A, H	280	On
VA9*510/50*AmCya...	A, H	308	On

Threshold Operator:	OR
<u>Threshold Parameters</u>	<u>Threshold</u>
FSC	20,000

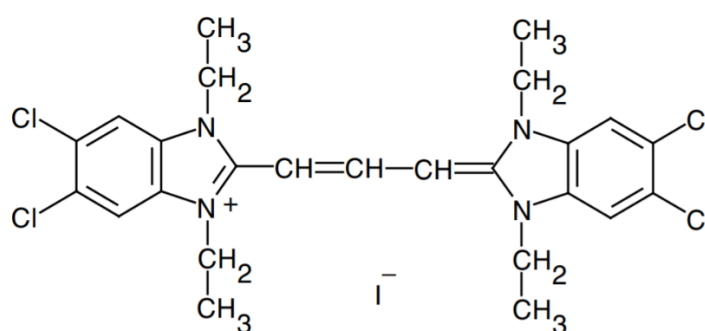
Obrázek 3.2: Nastavení průtokového cytometru pro analýzu fibroblastů značených GPI markery. Přesné parametry nastavení průtokového cytometru BD FACSCanto (BD Biosciences) použité při analýze defektů GPI kotvy u buněk značených specifickými GPI markery. Výsledky byly získány prostřednictvím programu BD FACSDiva (BD Biosciences) ve spolupráci s doc. MUDr. Janem Živným, PhD. a Ing. Martinem Bájecným z Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK.

Tabulka 3.3: Složení vzorků pro analýzu defektů GPI kotvy. Vždy byl nejprve připraven roztok příslušného markeru ve FACS roztoku, který byl poté v celkovém objemu 100 μ l přidán k peletě obsahující přibližně 1 milion buněk.

Buněčná linie	Objem (μ l)			
	FLAER	CD55	CD59	FACS roztok
K1	–	–	–	100
K1	5	–	–	95
K1	–	10	–	90
K1	–	–	4	96
K1	–	10	4	86
K2	–	–	–	100
K2	5	–	–	95
K2	–	10	4	86
K3	–	–	–	100
K3	5	–	–	95
K3	–	10	4	86
P1	–	–	–	100
P1	5	–	–	95
P1	–	10	4	86
P2	–	–	–	100
P2	5	–	–	95
P2	–	10	4	86

Analýza membránového potenciálu mitochondrií pomocí fluorescenční sondy JC-1

Mitochondriální membránový potenciál je jedním z parametrů, pomocí kterého lze sledovat a zhodnotit viabilitu a správnou funkčnost mitochondrií v buňkách. Nepoškozené mitochondrie vytváří na membráně elektrochemický protonový gradient, který využívají k syntéze ATP. V případě, že dojde k poškození mitochondrií, dochází k narušení membrány a následně ke ztrátě elektrochemického gradientu [90]. Použití fluorescenčně značené sondy JC-1 (Obrázek 3.3) umožňuje sledování mitochondriálního membránového potenciálu ve vitálních buňkách.



Obrázek 3.3: Sonda JC-1. Chemická struktura fluorescenční sondy mitochondriálního membránového potenciálu JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbokyanin jodid). Převzato z [91].

Po trypsinizaci bylo přidáno 3,5 ml 10% (v/v) iFBS/PBS na 75cm² láhev, buňky byly rozsuspendovány a jejich množství bylo stanoveno pomocí počítací pipety (Scepter Handheld Cell Counter, Millipore). Buněčná suspenze byla rozdělena do kónických zkumavek tak, aby v každé zkumavce bylo přibližně 400 000 buněk. Vzorky byly centrifugovány (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), supernatant byl odsát.

Od následujícího kroku byly vzorky zpracovávány ve tmě. K negativním kontrolám byl přidán 1 µl DMSO, k pozitivním kontrolám byl přidán 1 µl 40 µM FCCP v DMSO (FCCP indukuje disipaci membránového potenciálu mitochondrií). Byly připraveny roztoky JC-1 v promývacím pufru o výsledných koncentracích 0,5 µM, 2 µM a 5 µM. Tyto roztoky byly po 500 µl přidány k připraveným vzorkům, každá koncentrace roztoku JC-1 vždy k pozitivní i negativní kontrole. Do slepého vzorku bylo přidáno 500 µl promývacího pufru. Vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě v inkubátoru

(Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo) při 37 °C. Následně byly přidány 3 ml promývacího pufru, vzorky byly promíchány a centrifugovány (Rotanda 460R, Hettich Zentrifugen; 500x g, 5 min, laboratorní teplota), supernatant byl odsát. Pelety byly rozsuspendovány v 500 µl promývacího pufru a vzorky byly uchovávány v termobloku ve tmě až do analýzy pomocí průtokového cytometru (BD FACSCanto, BD Biosciences) v programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Přesné parametry pro nastavení průtokového cytometru jsou uvedeny v Obrázku 3.4.

Parameters	Type	Voltage	Log
FSC	A, H, W	180	Off
SSC	A, H, W	300	Off
BE4*530/30*FITC	A, H	310	On
BD3*585/42*PE	A, H	250	On
BB2*670/LP*PerCP	A, H	484	On
BA1*780/60*PE-Cy7	A, H	450	On
RC7*660/20*APC	A, H	400	On
RA6*780/60*APC-C...	A, H	431	On
VB8*450/50*Pacif...	A, H	280	On
VA9*510/50*AmCya...	A, H	308	On

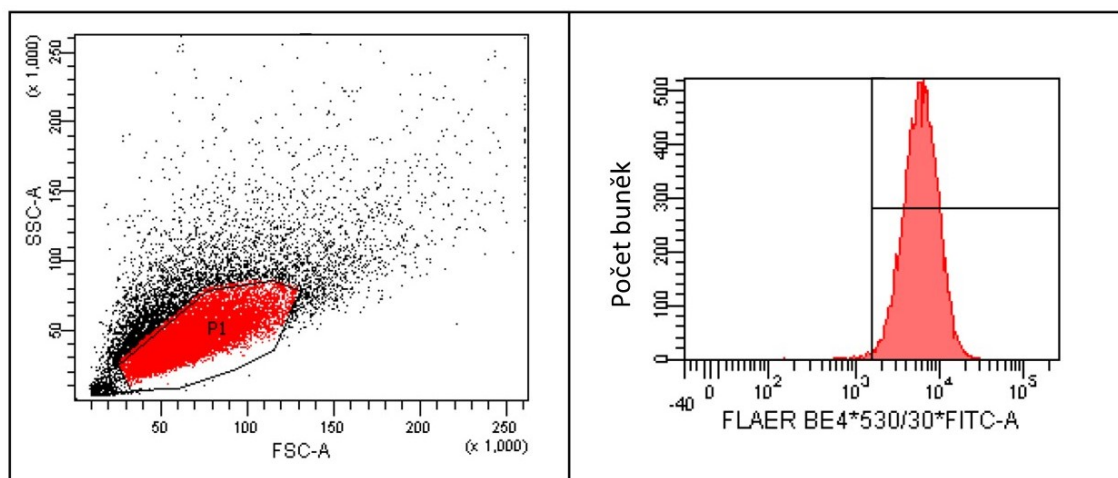
Threshold Operator:	OR
Threshold Parameters	Threshold
FSC	20,000

Obrázek 3.4: Nastavení průtokového cytometru pro analýzu fibroblastů značených sondou JC-1. Přesné parametry nastavení průtokového cytometru BD FACSCanto (BD Biosciences) použité při analýze mitochondriálního membránového potenciálu u buněk značených sondou JC-1. Výsledky byly získány prostřednictvím programu BD FACSDiva (BD Biosciences) ve spolupráci s doc. MUDr. Janem Živným, PhD. a Ing. Martinem Báječným z Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK.

Vyhodnocení dat z průtokového cytometru

Analýza značených vzorků pro všechny provedené experimenty průtokové cytometrie probíhala na průtokovém cytometru BD FACSCanto (BD Biosciences). Intenzita signálu byla vyhodnocována prostřednictvím programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Nejprve byl automaticky vytvořen bodový graf (z angl. *dot-plot*) zachycující všechny signály z detektorů. Následně byla vždy vybrána sledovaná populace buněk. Ze sledovaného vzorku byly vyřazeny mrtvé buňky a buněčné fragmenty, zvolená oblast obsahovala pouze živé buňky s požadovanou buněčnou granularitou. Pro zvolenou buněčnou populaci byl poté vytvořen i jednoparametrový histogram, ve kterém lze snadno pozorovat četnost buněk s příslušnou intenzitou signálu (Obrázek 3.5, str. 48). Pro vytvoření sloupcových grafů pak byly u všech vzorků použity střední hodnoty

(medián). Experimenty byly měřeny a vyhodnocovány v Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK ve spolupráci s doc. MUDr. Janem Živným, PhD. a Ing. Martinem Báječným.



Obrázek 3.5: Reprezentativní grafy z průtokového cytometru. V levé části obrázku je zobrazen bodový graf s vybranou buněčnou populací P1. Lze v něm pozorovat přímý rozptyl (osa x) i boční rozptyl (osa y) a používá se pro multiparametrovou analýzu. V pravé části obrázku je znázorněn jednorozměrný histogram, ve kterém je na ose x zaznamenána intenzita signálu sledovaných buněk či markerů a na ose y pak jejich četnost. Histogramy jsou využívány pro snadné sledování jednoho měřeného parametru.

3.5.3 Fluorescenční mikroskopie

Pro všechny experimenty s využitím fluorescenční mikroskopie byly buněčné linie fibroblastů nejprve kultivovány v 75cm² láhvích. Poté byly v laminárním boxu 2x opláchnuty přibližně 5 ml PBS, do každé láhve bylo přidáno 1,5 ml roztoku T + E a láhve byly inkubovány 5 minut při 37 °C. Buňky byly rozsuspendovány v 3,5 ml vyhřátého DMEM média. Pomocí počítací pipety (Scepter Handheld Cell Counter, Millipore) bylo stanoveno množství buněk, které byly následně naneseny na podložní sklíčka v 24jamkové kultivační destičce v množství přibližně 20 000 buněk/sklo. Buňky byly dále pěstovány v DMEM médiu do konfluence 70–80 %.

Detekce sializace pomocí SNA lektinu

Pro detekci sializace za použití značení SNA lektinem byly kultivovány buňky z každé linie na dvou sklíčkách. Před značením SNA lektinem byly buňky na jednom sklíčku od každé linie inkubovány s 250 µl DMEM média s neuraminidasou (200 µU/ml) po dobu 1 hodiny při 37 °C v inkubátoru (Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo). Následně bylo odsáto médium ze všech sklíček a všechna sklíčka byla omyta 2x 500 µl PBS. Poté byly buňky fixovány v 1% (v/v) PFA/PBS po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po fixaci byla sklíčka omyta 3x 500 µl PBS. Pro značení bylo přidáno na každé sklíčko

500 μ l roztoku SNA lektinu (10 μ g/ml) v 1% (v/v) iFBS/PBS a vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C (inkubátor TCH100, Laboratorní přístroje Praha) v destičce obalené alobalem pro ochranu před světlem. Po inkubaci byl roztok lektinu odsát a sklíčka byla opět omyta 3x 500 μ l PBS.

Pro snímání fluorescenčního signálu byla sklíčka umístěna do plastové nádoby pro sklíčka s 500 μ l PBS. Mikroskop (Eclipse Ti2-U, Nikon) byl nastaven podle následujících parametrů: zvětšení 10 x 10; objektiv Plan Fluor ELWD 10x Ph1 DL; numerická apertura objektivu 0,3; index lomu 1,000. Fluorescenční signál byl sledován na mikroskopu a zaznamenáván prostřednictvím programu NIS-Elements BR Analysis (Nikon). Následně byla z pořízených snímků vybrána reprezentativní skupina vždy 15 značených buněk z příslušného sklíčka, jejichž fluorescenční signál byl kvantifikován v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin).

Detekce defektů GPI kotvy pomocí specifických markerů

Při tomto značení byly kultivovány buňky na třech sklíčkách od každé buněčné linie. V laminárním boxu bylo odsáto médium a každé sklíčko bylo opláchnuto 2x 500 μ l PBS. Poté bylo již nesterilně přidáno na každé sklíčko 500 μ l 1% (v/v) PFA/PBS pro fixaci a takto byla sklíčka inkubována 10 minut za laboratorní teploty. Po inkubaci byl fixační roztok odsát a sklíčka opláchnuta 3x 500 μ l PBS. Následně bylo přidáno na každé sklíčko 500 μ l 5% (v/v) iFBS/PBS a vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl roztok odsát. Z každé buněčné linie bylo na první sklíčko přidáno 200 μ l 5% (v/v) FLAER v 5% (v/v) iFBS/PBS, na druhé sklíčko 200 μ l 10% (v/v) CD55 v 5% (v/v) iFBS/PBS a na třetí sklíčko 4% (v/v) CD59 v 5% (v/v) iFBS /PBS. Všechny vzorky byly inkubovány přes noc v destičce obalené alobalem pro ochranu před světlem při teplotě 4 °C. Druhý den byl roztok markeru odsát, sklíčka byla omyta 3x 500 μ l PBS.

Pro snímání fluorescenčního signálu byla sklíčka umístěna do plastové nádoby pro sklíčka s 500 μ l PBS. Mikroskop (Eclipse Ti2-U, Nikon) byl nastaven podle následujících parametrů: zvětšení 10 x 20; objektiv S Plan Fluor ELWD 20x Ph1 ADM; numerická apertura objektivu 0,45; index lomu 1,000. Fluorescenční signál byl sledován na mikroskopu a zaznamenáván prostřednictvím programu NIS-Elements BR Analysis (Nikon). Následně byla z pořízených snímků vybrána reprezentativní skupina vždy 15 značených buněk z příslušného sklíčka, jejichž fluorescenční signál byl kvantifikován v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin).

Detekce membránového potenciálu mitochondrií pomocí fluorescenční sondy JC-1

Následující kroky byly prováděny po celou dobu sterilně, jelikož se jednalo o vitální značení buněk, a z každé buněčné linie byly kultivovány buňky na dvou sklíčkách. V laminárním boxu bylo odsáto médium. K jednomu sklíčku od každé linie bylo přidáno 500 μ l 0,5 μ M JC-1 v DMEM médiu a ke druhému sklíčku bylo přidáno 500 μ l 0,5 μ M JC-1 v DMEM médiu s 40 μ M FCCP. Takto byly vzorky inkubovány 30 minut ve tmě při 37 °C (Sanyo CO₂ inkubátor MCO-18AIC, Sanyo). Poté byla všechna sklíčka opláchnuta 3x 500 μ l PBS předem vyhřátého na 37 °C.

Pro snímání fluorescenčního signálu byla sklíčka umístěna do plastové nádoby pro sklíčka s 500 μ l PBS předem vyhřátého na 37 °C. Mikroskop (Eclipse Ti2-U, Nikon) byl nastaven podle následujících parametrů: zvětšení 10 x 40; objektiv S Plan Fluor ELWD 40x Ph2 ADM; numerická apertura objektivu 0,6; index lomu 1,000. Fluorescenční signál byl sledován na mikroskopu, zaznamenáván prostřednictvím programu NIS-Elements BR Analysis (Nikon) a následně kvantifikován v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin).

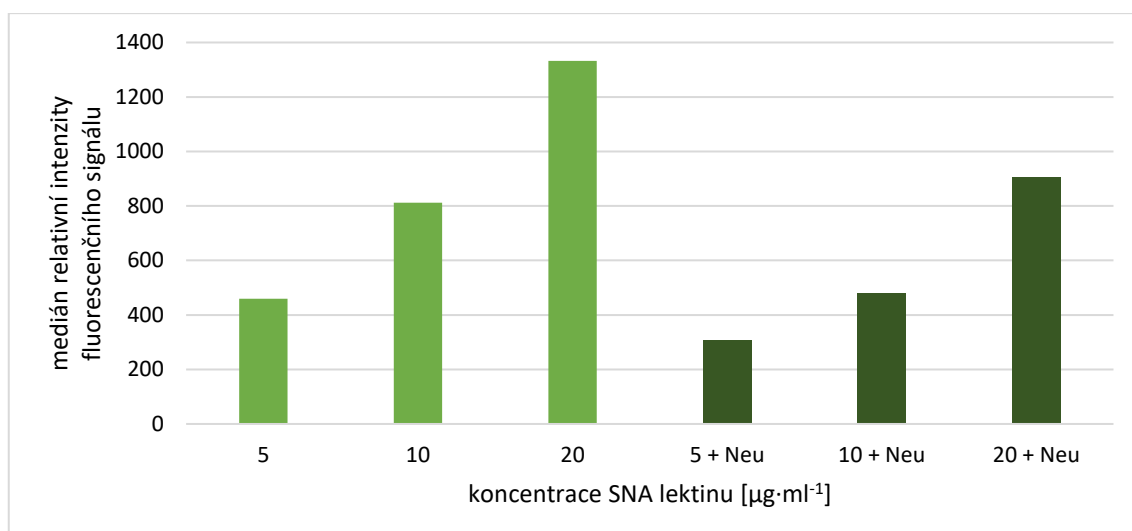
4 Výsledky

4.1 Stanovení sializace ve fibroblastech značených SNA lektinem

Nejprve byla provedena optimalizace pro stanovení vhodné koncentrace fluorescenčně značeného SNA lektinu, jelikož se jednalo o pilotní experimenty. Pro optimalizaci byla použita kontrolní linie fibroblastů (K1), která byla značena roztoky SNA lektinu o koncentracích 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$. Pozitivní kontrola byla zajištěna vzorky, ke kterým byla navíc přidána neuraminidasa v koncentraci 200 $\mu\text{U/ml}$. Enzym neuraminidasa hydrolyticky odštěpuje kyselinu sialovou z glykanového řetězce, čímž dochází ke snížení množství vazebných míst pro SNA lektin. Naměřené hodnoty mediánu ukázaly téměř lineární nárůst intenzity signálu v závislosti na zvyšující se koncentraci SNA lektinu (Obrázek 4.1, str. 52). Rovněž byl potvrzen pokles intenzity signálu v případě vzorků obsahujících roztok neuraminidasy. Na základě získaných dat byla pro další experimenty zvolena jako vhodné množství SNA lektinu koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$. Při této koncentraci nedocházelo k zaznamenávání falešně vyššího signálu způsobeného nespecifickou vazbou nebo přítomností nenavázaného SNA lektinu a zároveň tato koncentrace poskytovala dostatečně silný signál pro detekci metodou průtokové cytometrie i fluorescenční mikroskopie.

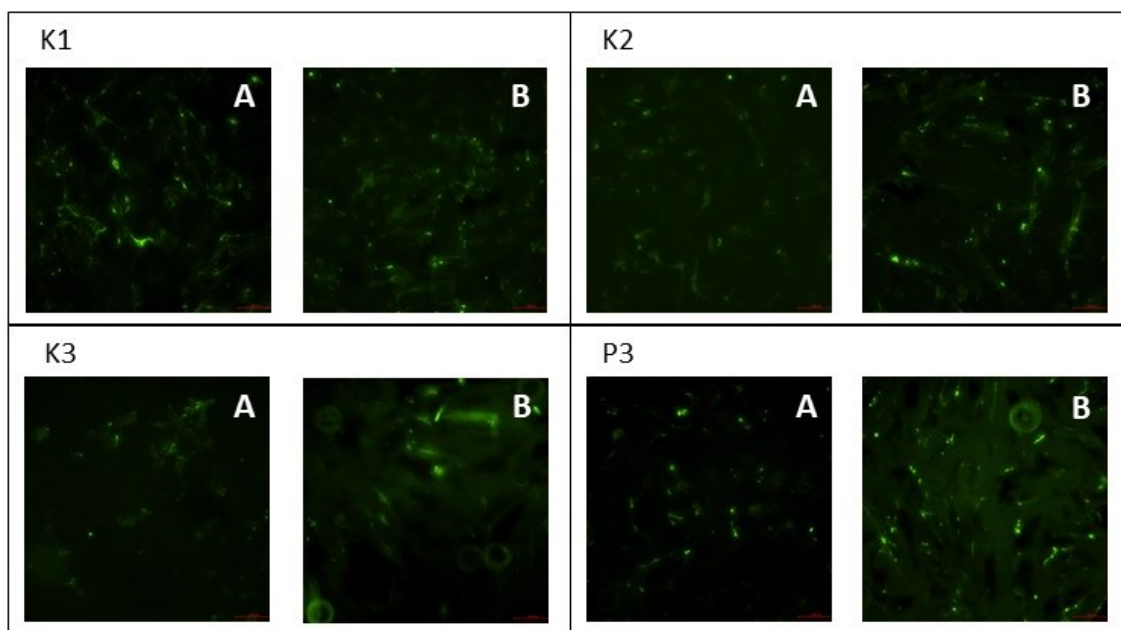
Následně byly experimenty provedeny s větším počtem buněčných linií, konkrétně K1, K2, K3 a P3 pro fluorescenční mikroskopii a K1, K3, K5, P3, P4 a P5 pro průtokovou cytometrii, opět s pozitivní kontrolou zajištěnou přidavkem roztoku neuraminidasy (200 $\mu\text{U/ml}$).

Výsledky z fluorescenční mikroskopie (Obrázek 4.2 a 4.3, str. 53) zřetelně zachycují snížený signál u vzorků s neuraminidasou, což potvrzuje snížené množství vázané kyseliny sialové v těchto vzorcích. V případě pacienta P3 je viditelný mírně zvýšený fluorescenční signál vůči zdravým kontrolám. Toto zjištění by mohlo naznačovat přítomnost hypersialovaných forem glykoproteinů, jejichž výskyt je ovšem u CDG velmi výjimečný.

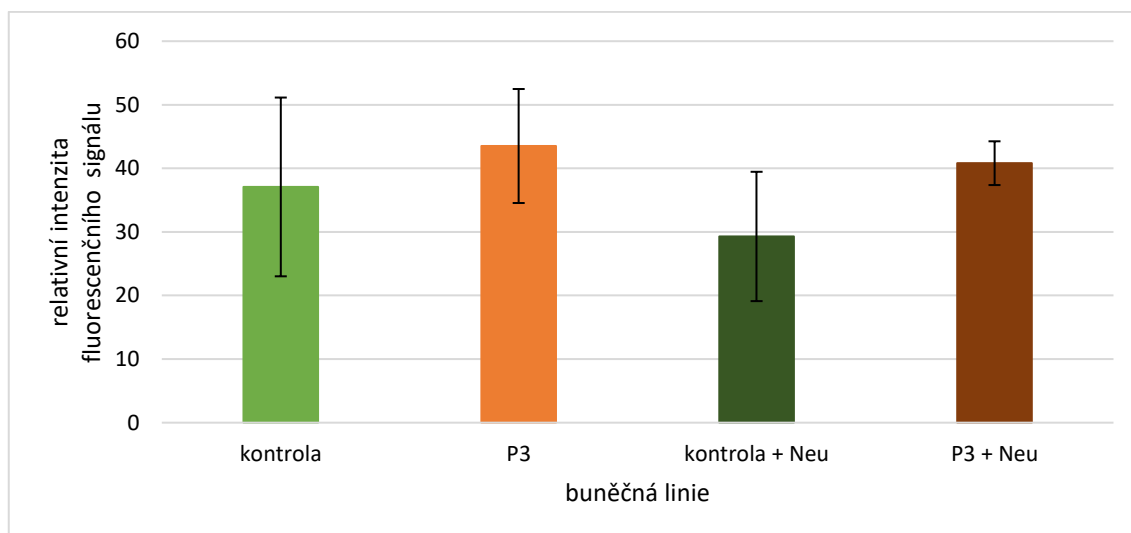


Obrázek 4.1: Optimalizace koncentrace SNA lektinu pro stanovení sializace v kultivovaných kožních fibroblastech. Při optimalizaci byly testovány tři koncentrace SNA lektinu (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Jako pozitivní kontrola byly použity vzorky obsahující navíc roztok neuraminidasy (Neu) o koncentraci 200 $\mu\text{U}/\text{ml}$. Data byla vyhodnocována v programu BD FACSDiva (BD Biosciences) a pro výsledný graf byly použity hodnoty mediánu.

Pro ověření dat z FM byla podle stejného protokolu provedena stanovení sializace prostřednictvím průtokového cytometru. Přestože byla analýza provedena opakovaně, nepodařilo se získat validní výsledky. Z prozatím neznámých důvodů docházelo k poklesu signálu u všech sledovaných vzorků v porovnání s výsledky optimalizace metody, a to přesto, že byly zachovány totožné podmínky. Na základě výsledků z FM byl vyloučen problém s nefunkčním fluorescenčně značeným SNA lektinem i nefunkční neuraminidasou. Nicméně odhalení příčiny odlišných výsledků bude vyžadovat změny podmínek a nové experimenty.



Obrázek 4.2: Analýza sializace v kultivovaných kožních fibroblastech prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Vybrané reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu zachycují fluorescenční signál fibroblastů tří kontrol (K1, K2, K3) a pacienta P3 s ATP6AP1-CDG značených SNA lektinem o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Část A zachycuje vzorky, ke kterým byl přidán roztok neuraminidasy (200 $\mu\text{U/ml}$), a je zde patrný snížený fluorescenční signál v porovnání se snímky značených fibroblastů bez přidání neuraminidasy (část B). V případě pacienta P3 je viditelný mírně vyšší signál v části A i B v porovnání s kontrolami. Snímky byly pořízeny v programu NIS-Elements BR Analysis (Nikon), při zvětšení mikroskopem 100x (Eclipse Ti2-U, Nikon).



Obrázek 4.3: Kvantifikace intenzity signálu pro stanovení sializace prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční signál ze snímků fibroblastů kontrol a pacienta P3 s ATP6AP1-CDG značených SNA lektinem o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ pořízených fluorescenčním mikroskopem byl analyzován v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin). Pro kvantifikaci signálu byla vybrána reprezentativní skupina vždy 15 buněk ($n = 15$) z příslušného značení, hodnota kontroly byla stanovena jako průměr hodnot

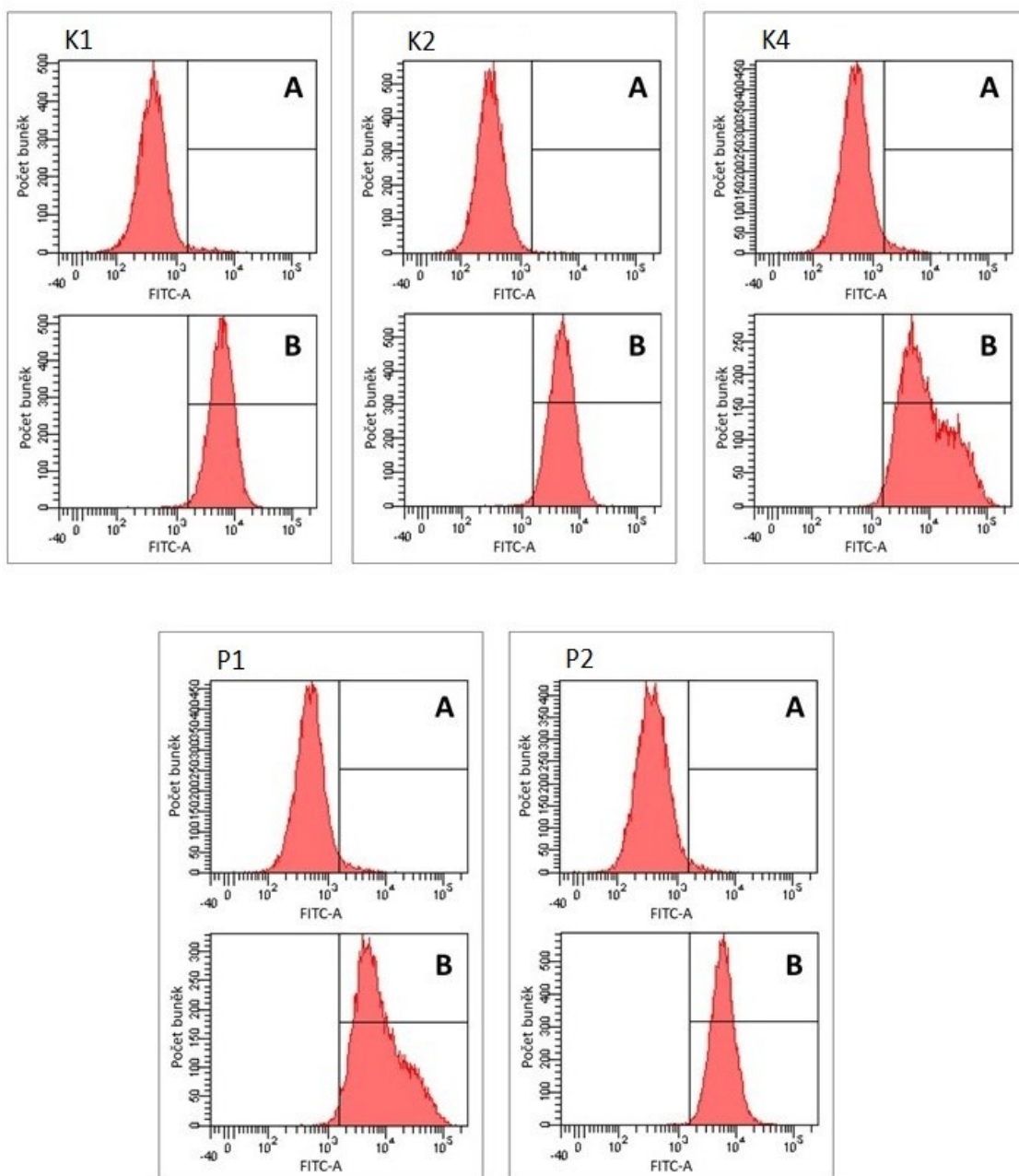
kontrolních linií (K1, K2, K3). Kvantifikace relativní intenzity signálu prokázala nižší signál u vzorků s přidavkem roztoku neuraminidasy (Neu) o koncentraci 200 μ U/ml. V případě pacienta P3 potvrdila zvýšený signál u obou vzorků (bez i s neuraminidasou) v porovnání s kontrolami.

4.2 Stanovení exprese specifických markerů GPI kotvy ve fibroblastech

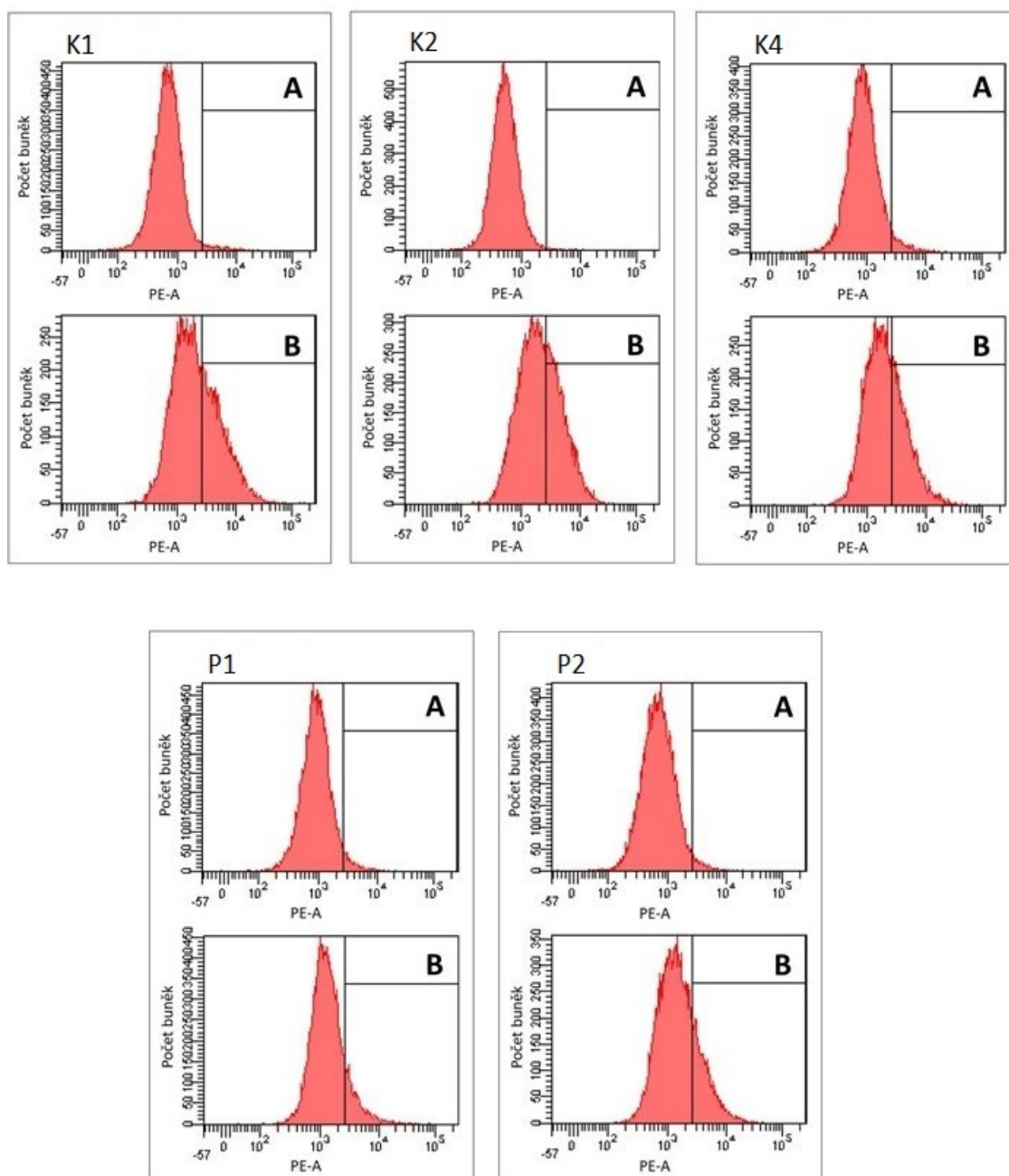
Pro sledování přítomnosti a správné funkce GPI kotvy ve fibroblastech zdravých kontrol a pacientů diagnostikovaných s CDG byly použity tři specifické markery GPI kotvy. Vzorky kontrolních buněčných linií (K1, K2 a K4) spolu s buňkami pacientů (P1 a P2) byly inkubovány spolu s fluorescenčně značenými markery FLAER (5% (v/v)), CD55 (10% (v/v)) a CD59 (4% (v/v)).

Intenzita fluorescenčního signálu neznačených a značených vzorků byla analyzována s využitím jednorozměrných histogramů FACS (Obrázek 4.4–4.6, str. 55–57). Hodnoty mediánu odhalily významně sníženou expresi proteinu CD55 u obou pacientů v porovnání s kontrolami (Obrázek 4.8, str. 58). V případě P1 došlo k poklesu o 71 %, v případě P2 pak o 43 %. Naproti tomu nebyla zachycena žádná signifikantní změna v expresi FLAER či proteinu CD59 (Obrázek 4.7, str. 58, resp. Obrázek 4.9, str. 59).

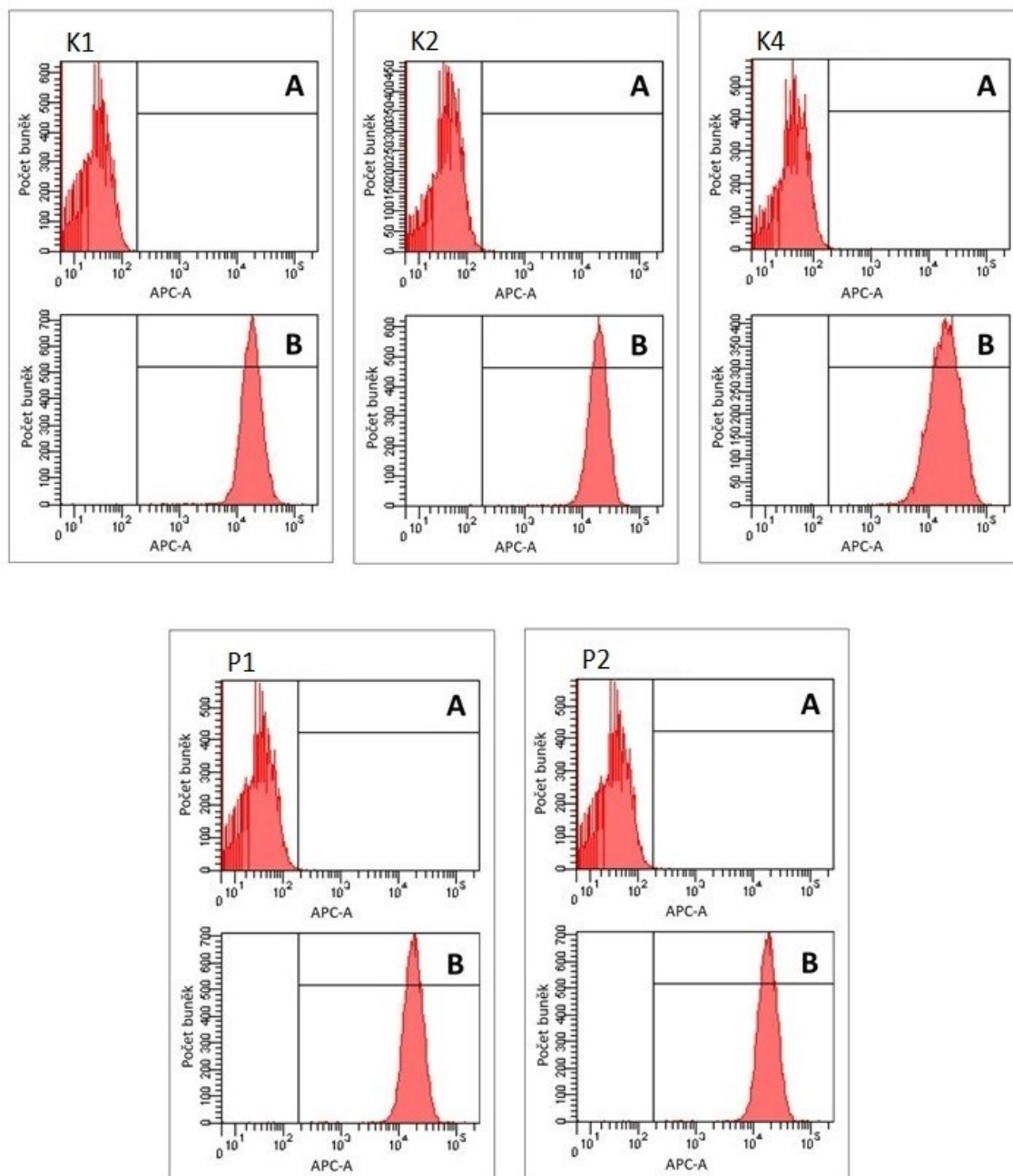
Výsledky z fluorescenční mikroskopie (Obrázek 4.13, str. 61) potvrdily pokles fluorescenčního signálu v případě proteinu CD55 u obou pacientů (Obrázek 4.11, str. 60), ačkoli se nejednalo o tak dramatické snížení výsledků (u P1 pokles o 35 %, u P2 o 26 %) jako v případě analýzy FACS. Tato data korespondují s předpokládanou vyšší citlivostí techniky FACS. Ve shodě s předchozími výsledky FACS byl i detekovaný signál markeru FLAER (Obrázek 4.10, str. 59), který neodhalil žádnou změnu exprese GPI kotvy u pacientů v porovnání s kontrolami. Naopak rozdíl přinesla analýza proteinu CD59, který byl při detekci FM u P1 v porovnání s kontrolami výrazně snížený (o 51 %), zatímco u P2 nebyla pozorována téměř žádná změna exprese (Obrázek 4.12, str. 60). Rozpor výsledků v případě CD59 získaných FACS a FM bude předmětem dalšího zkoumání.



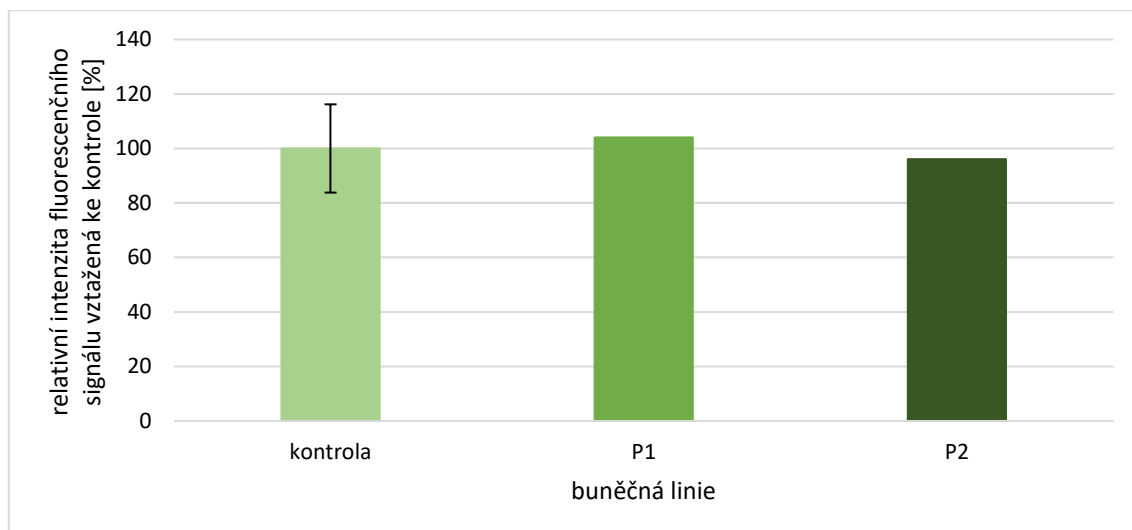
Obrázek 4.4: Analýza exprese GPI markeru FLAER v kultivovaných kožních fibroblastech. Jednorozměrné histogramy z průtokového cytometru zachycují intenzitu signálu sondy FLAER. Pro vyhodnocení exprese GPI markeru FLAER byly použity hodnoty mediánu získané z histogramů FACS v programu BD FACSDiva (BD Biosciences) zaznamenávajících četnost buněk v závislosti na intenzitě signálu. Byly zkoumány tři kontrolní buněčné linie (K1, K2 a K4) a dvě buněčné linie pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD). Horní histogram vždy zachycuje neznačené fibroblasty (část A) a spodní histogram (část B) pak odpovídá signálu fibroblastů značených sondou FLAER (5% (v/v)). Při porovnání části A a B pro jednotlivé buněčné linie lze pozorovat posun píku směrem doprava, což odpovídá zvýšení intenzity fluorescenčního signálu u značených vzorků.



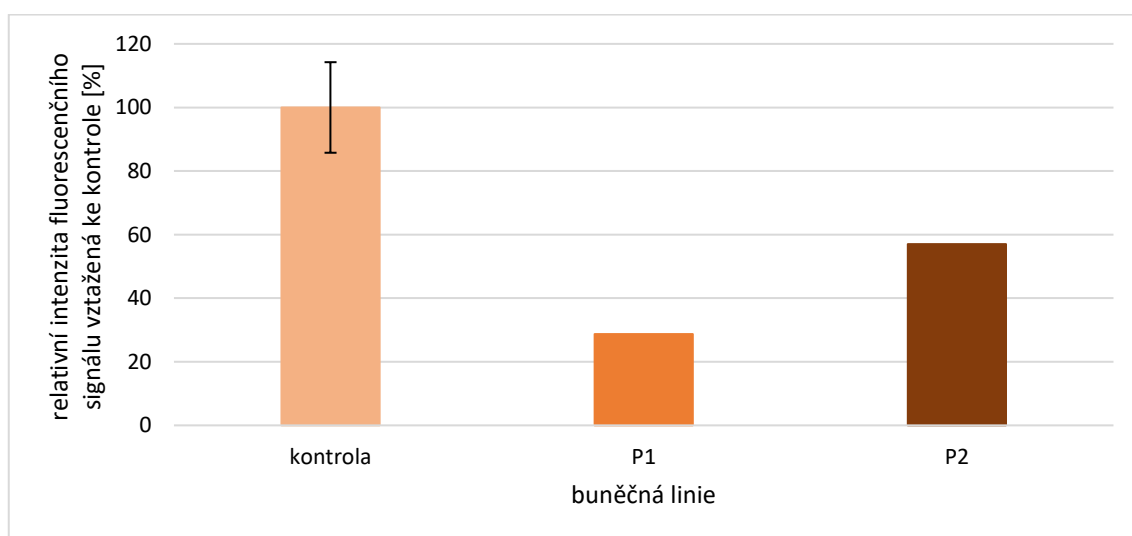
Obrázek 4.5: Analýza exprese proteinu CD55 v kultivovaných kožních fibroblastech. Jednorozměrné histogramy z průtokového cytometru zachycují intenzitu signálu fluorescenčně značené protilátky proti proteinu CD55. Pro vyhodnocení exprese proteinu CD55 byly použity hodnoty mediánu získané z histogramů FACS v programu BD FACSDiva (BD Biosciences) zaznamenávajících četnost buněk v závislosti na intenzitě signálu. Byly zkoumány tři kontrolní buněčné linie (K1, K2 a K4) a dvě buněčné linie pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD). Horní histogram vždy zachycuje neznačené fibroblasty (část A) a spodní histogram (část B) pak odpovídá signálu fibroblastů značených protilátkou proti proteinu CD55 (10% (v/v)). Při porovnání části A a B pro kontrolní buněčné linie lze pozorovat posun píku směrem doprava, což odpovídá zvýšení intenzity fluorescenčního signálu u značených vzorků. V případě obou pacientů je tento posun poměrně malý a poukazuje na pokles intenzity signálu u vzorků P1 a P2 v porovnání s kontrolami.



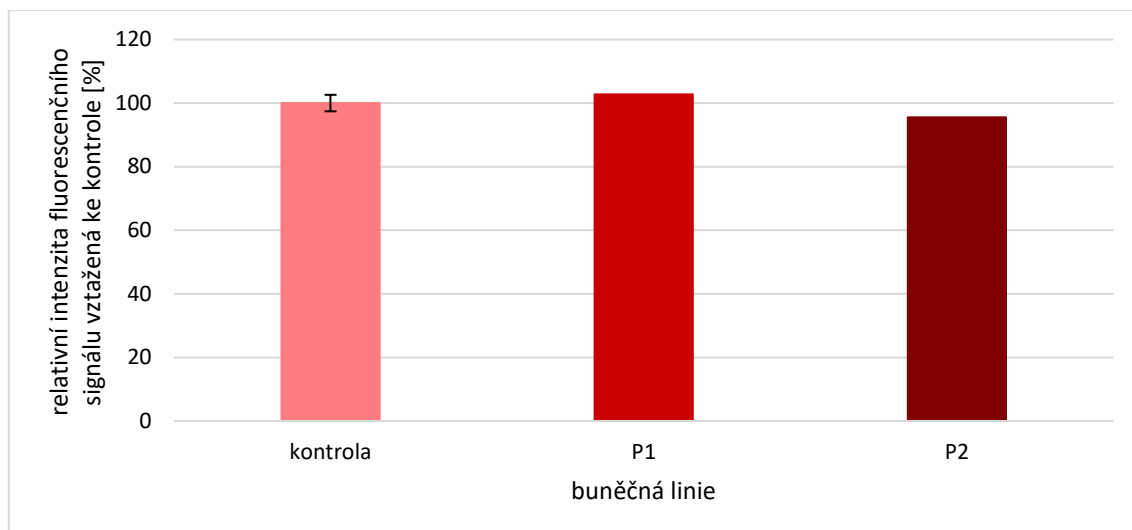
Obrázek 4.6: Analýza exprese proteinu CD59 v kultivovaných kožních fibroblastech. Jednorozměrné histogramy z průtokového cytometru zachycují intenzitu signálu fluorescenčně značené protilátky proti proteinu CD59. Pro vyhodnocení exprese proteinu CD59 byly použity hodnoty mediánu získané z histogramů FACS v programu BD FACSDiva (BD Biosciences) zaznamenávajících četnost buněk v závislosti na intenzitě signálu. Byly zkoumány tři kontrolní buněčné linie (K1, K2 a K4) a dvě buněčné linie pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD). Horní histogram vždy zachycuje neznačené fibroblasty (část A) a spodní histogram (část B) pak odpovídá signálu fibroblastů značených protilátkou proti proteinu CD59 (4% (v/v)). Při porovnání části A a B pro jednotlivé buněčné linie lze pozorovat výrazný posun píku směrem doprava, což odpovídá vysokému nárůstu intenzity fluorescenčního signálu u značených vzorků.



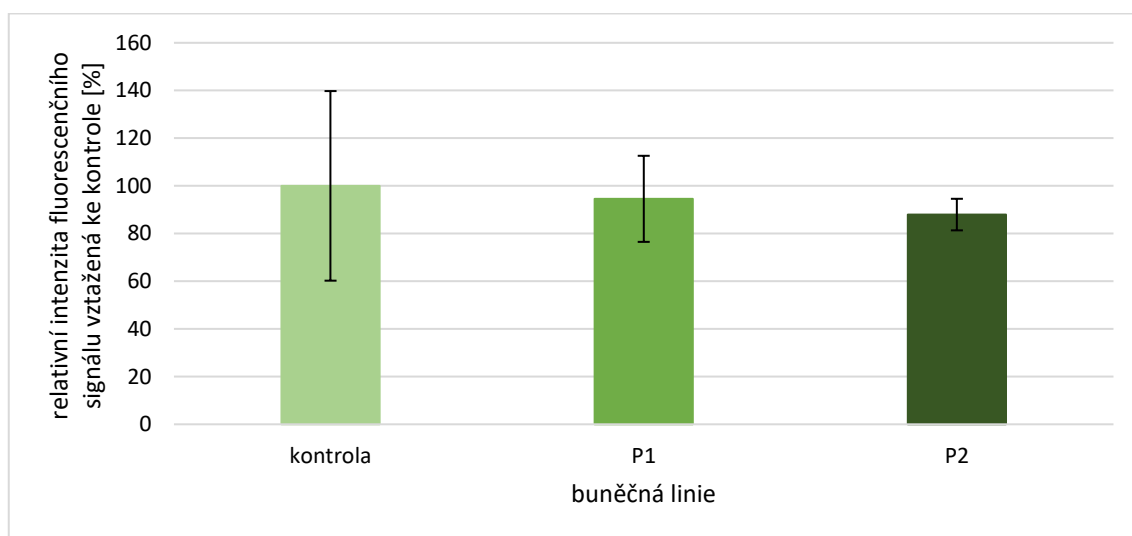
Obrázek 4.7: Kvantifikace intenzity signálu pro stanovení exprese sondy FLAER prostřednictvím průtokové cytometrie. Fluorescenční signál ze vzorků fibroblastů kontrol a pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD) značených 5% (v/v) FLAER byl analyzován v programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Pro výsledný graf byly použity hodnoty stanovené jako rozdíl hodnot mediánu intenzity signálu značených vzorků a příslušných hodnot mediánu intenzity signálu vzorků neznačených (pozadí). Hodnota kontroly byla stanovena jako průměr hodnot kontrolních linií (K1, K2, K4). V případě markeru FLAER nebyly odhaleny žádné významné změny v expresi mezi buněčnými liniemi kontrol a pacientů.



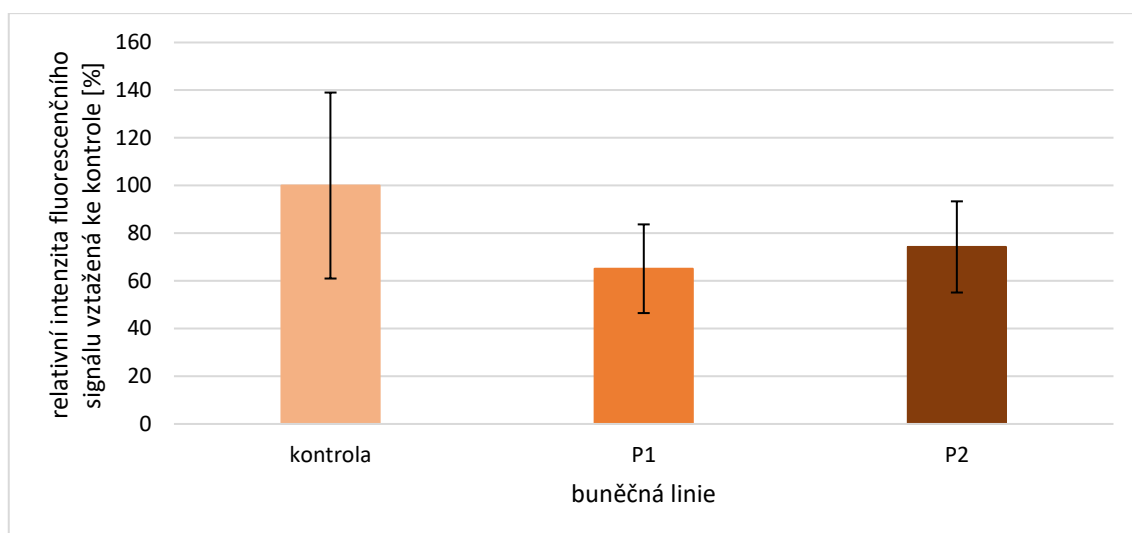
Obrázek 4.8: Kvantifikace intenzity signálu pro stanovení exprese proteinu CD55 prostřednictvím průtokové cytometrie. Fluorescenční signál ze vzorků fibroblastů kontrol a pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD) značených 10% (v/v) CD55 byl analyzován v programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Pro výsledný graf byly použity hodnoty stanovené jako rozdíl hodnot mediánu intenzity signálu značených vzorků a příslušných hodnot mediánu intenzity signálu vzorků neznačených (pozadí). Hodnota kontroly byla stanovena jako průměr hodnot kontrolních linií (K1, K2, K4). Exprese proteinu CD55 byla zásadně snížena u obou pacientů (u P1 o 71 %, u P2 o 43 %) v porovnání s kontrolou.



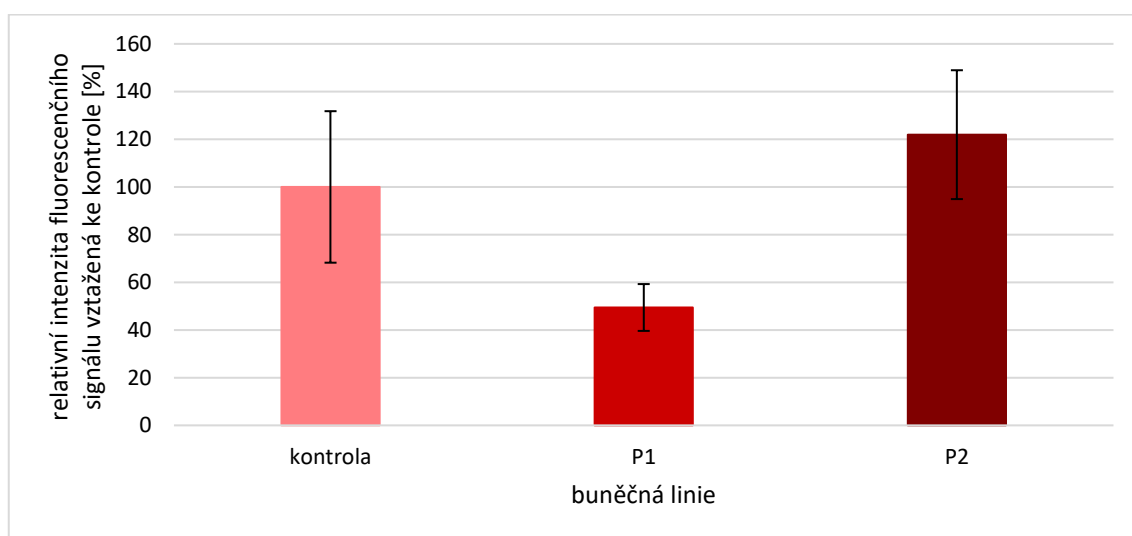
Obrázek 4.9: Kvantifikace intenzity signálu pro stanovení exprese proteinu CD59 prostřednictvím průtokové cytometrie. Fluorescenční signál ze vzorků fibroblastů kontrol a pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD) značených 4% (v/v) CD59 byl analyzován v programu BD FACSDiva (BD Biosciences). Pro výsledný graf byly použity hodnoty stanovené jako rozdíl hodnot mediánu intenzity signálu značených vzorků a příslušných hodnot mediánu intenzity signálu vzorků neznačených (pozadí). Hodnota kontroly byla stanovena jako průměr hodnot kontrolních linií (K1, K2, K4). V případě proteinu CD59 nebyly odhaleny žádné významné změny v expresi mezi buněčnými liniemi kontrol a pacientů.



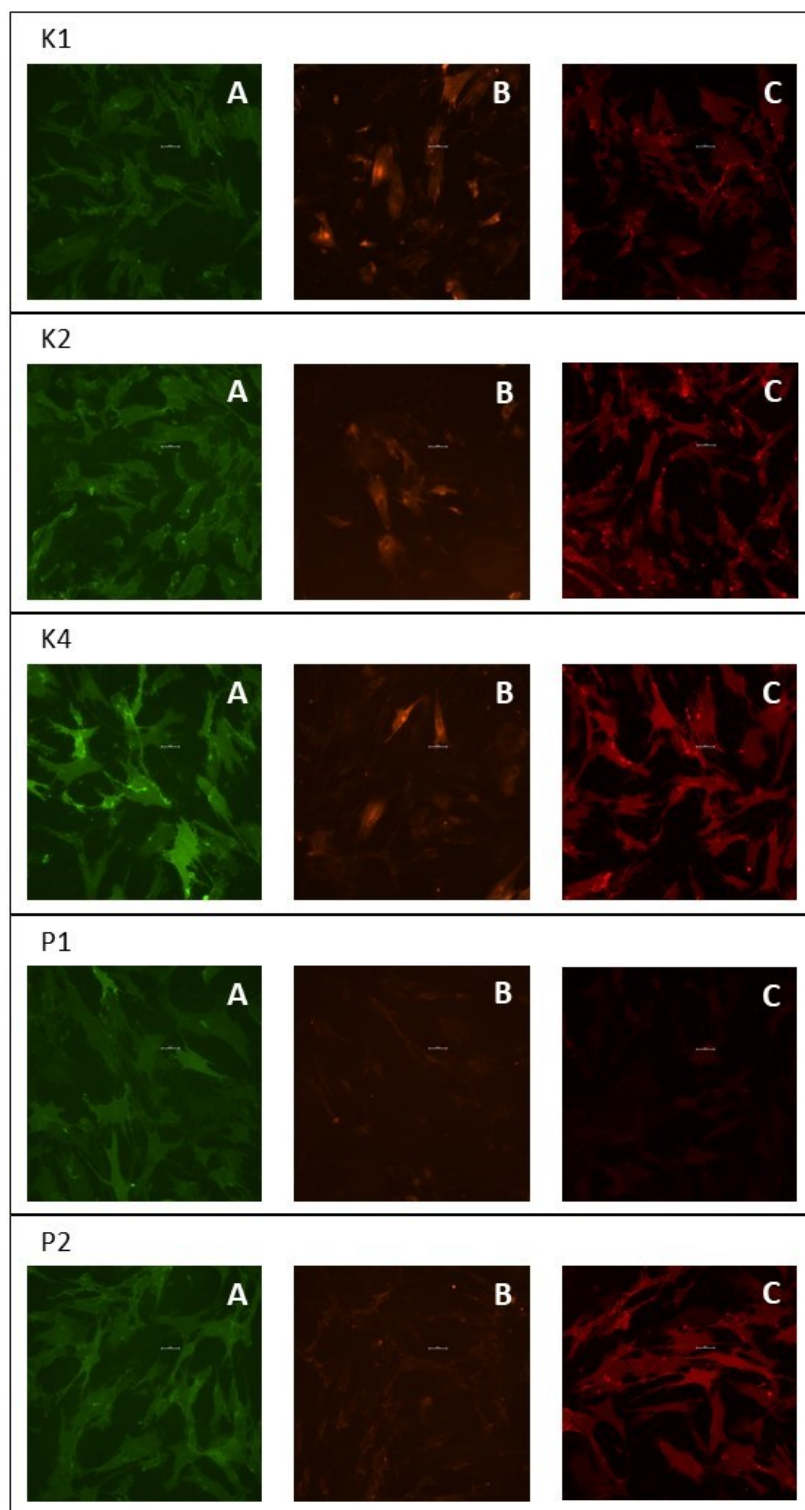
Obrázek 4.10: Kvantifikace intenzity signálu pro stanovení exprese sondy FLAER prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční signál ze snímků fibroblastů kontrol a pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD) značených 5% (v/v) FLAER pořízených fluorescenčním mikroskopem byl analyzován v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin). Pro kvantifikaci signálu byla vybrána reprezentativní skupina vždy 15 buněk ($n = 15$) z příslušného značení, hodnota kontroly byla stanovena jako průměr hodnot kontrolních linií (K1, K2, K4). Kvantifikace relativní intenzity signálu neprokázala žádné významné rozdíly mezi fibroblasty zdravých kontrol a pacientů v případě exprese markeru FLAER.



Obrázek 4.11: Kvantifikace intenzity signálu pro stanovení exprese proteinu CD55 prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční signál ze snímků fibroblastů kontrol a pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD) značených 10% (v/v) CD55 pořízených fluorescenčním mikroskopem byl analyzován v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin). Pro kvantifikaci signálu byla vybrána reprezentativní skupina vždy 15 buněk ($n = 15$) z příslušného značení, hodnota kontroly byla stanovena jako průměr hodnot kontrolních linií (K1, K2, K4). Kvantifikace relativní intenzity signálu potvrdila snížený signál pro CD55 u obou pacientů v porovnání s kontrolou (u P1 pokles o 35 %, u P2 o 26 %).



Obrázek 4.12: Kvantifikace intenzity signálu pro stanovení exprese proteinu CD59 prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční signál ze snímků fibroblastů kontrol a pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD) značených 4% (v/v) CD59 pořízených fluorescenčním mikroskopem byl analyzován v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin). Pro kvantifikaci signálu byla vybrána reprezentativní skupina vždy 15 buněk ($n = 15$) z příslušného značení, hodnota kontroly byla stanovena jako průměr hodnot kontrolních linií (K1, K2, K4). Výsledky kvantifikace odhalily úbytek relativní intenzity signálu pro CD59 o 51 % v případě pacienta P1, zatímco u pacienta P2 byl signál srovnatelný s kontrolou.

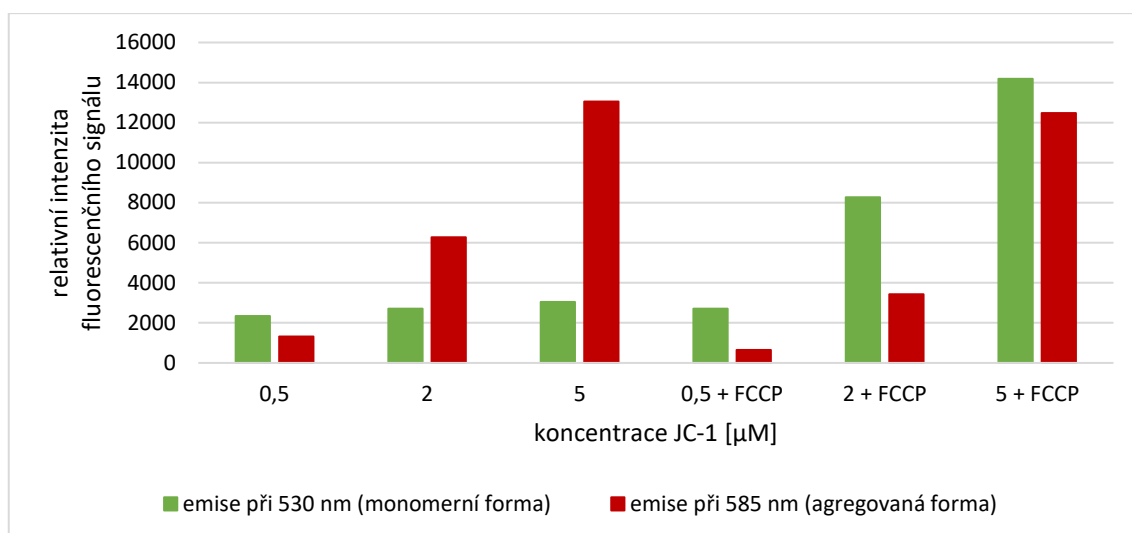


Obrázek 4.13: Stanovení exprese specifických GPI markerů prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Vybrané reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu zachycují fluorescenční signál z fibroblastů tří zdravých kontrol (K1, K2, K4) a dvou pacientů (P1 s defektem PIGN-CDG a P2 s deficitem PISD) značených specifickými GPI markery: A – FLAER (5% (v/v)); B – CD55 (10% (v/v)); C – CD59 (4% (v/v)). Významnými výsledky jsou pokles signálu v případě markeru CD55 u obou pacientů (P1 – B, P2 – B) a rovněž výrazné snížení signálu CD59 v případě pacienta P1 (C). Snímky byly pořízeny v programu NIS-Elements BR Analysis (Nikon), při zvětšení mikroskopem 200x (Eclipse Ti2-U, Nikon).

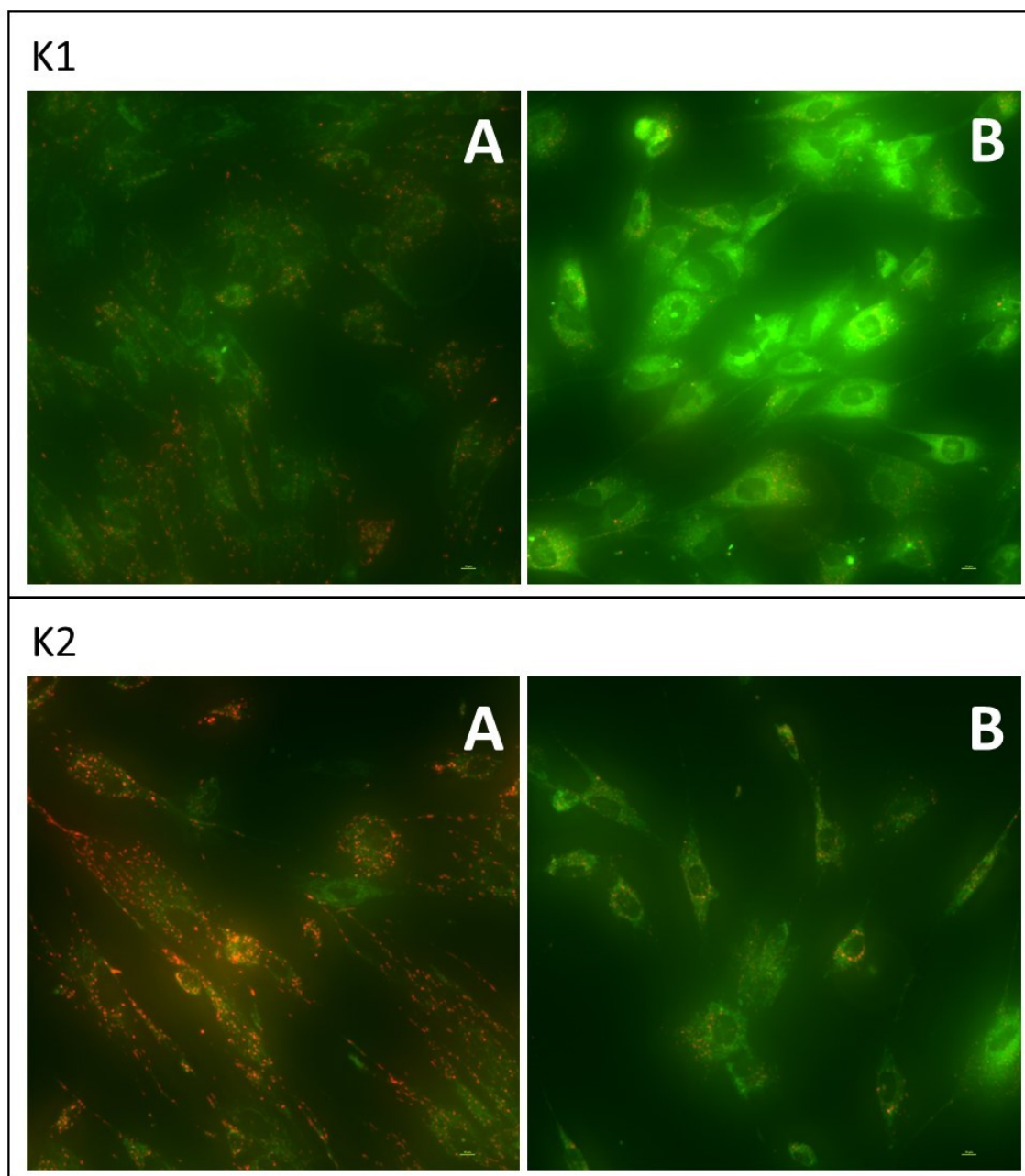
4.3 Stanovení membránového potenciálu v mitochondriích fibroblastů značených sondou JC-1

Při sledování mitochondriálního membránového potenciálu byly pro značení buněk kontrolní linie (K1) s analýzou na průtokovém cytometru použity koncentrace 0,5 μM , 2 μM a 5 μM JC-1 pro negativní kontrolu a 0,5 μM , 2 μM a 5 μM JC-1 s přidavkem 40 μM FCCP pro pozitivní kontrolu. Fluorescenční signál byl snímán při 530 nm („zelený“ kanál) a 585 nm („červený“ kanál), přičemž poměr těchto dvou hodnot vypovídá o funkčnosti mitochondrií ve sledovaných vzorcích. Pokud jsou mitochondrie zdravé a funkční, sonda JC-1 se vyskytuje převážně v agregované formě a poskytuje vyšší signál při 585 nm. Naopak mitochondrie se ztrátou membránového potenciálu, který je zde způsoben přidavkem FCCP, obsahují monomerní formu JC-1 zvyšující fluorescenční signál při 530 nm. Výsledky dokazují, že u vzorků bez rozpráhovače FCCP je sonda JC-1 přítomna v agregované formě. Po přidání FCCP se poměr fluorescenčních signálů ovšem mění ve prospěch monomerní formy (Obrázek 4.14, str. 63).

Pro značení s vyhodnocením fluorescenční mikroskopii byly použity dvě kontrolní buněčné linie (K1 a K2), které byly inkubovány s 0,5 μM JC-1 pro negativní kontrolu a 0,5 μM JC-1 s přidavkem 40 μM FCCP pro pozitivní kontrolu. Tato nižší koncentrace byla použita především kvůli šetrnému značení vitálních buněk. Bylo zjištěno, že inkubace delší než 30 minut velmi výrazně ovlivňuje strukturu a životnost značených fibroblastů. Tento negativní vliv byl umocněn přidavkem FCCP v případě pozitivních kontrol. Výsledky z fluorescenční mikroskopie (Obrázek 4.15, str. 64) se shodují s výsledky získanými technikou FACS. Bez přítomnosti FCCP je výrazněji viditelný červený signál měřený při 593/40 nm. Navíc lze sledovat typickou mitochondriální síť, která je rovnoměrně rozložena po celé buňce. V buňkách s přidavkem FCCP zcela dominuje zelený signál snímáný při 520/50 nm značící poškození buněk a ztrátu mitochondriálního protonového gradientu.



Obrázek 4.14: Stanovení membránového potenciálu v mitochondriích prostřednictvím průtokové cytometrie. Fibroblasty dvou zdravých kontrol (K1 a K2) byly značeny 0,5 μM , 2 μM a 5 μM JC-1 pro negativní kontrolu a 0,5 μM , 2 μM a 5 μM JC-1 s 40 μM FCCP pro pozitivní kontrolu. Fluorescenční signál byl analyzován v programu BD FACSDiva (BD Biosciences) a pro výsledný graf byly použity hodnoty mediánu. Vzorky bez přídavku FCCP emitovaly výrazněji při 585 nm a převažovala v nich agregovaná forma sondy JC-1. U vzorků obsahující roztok FCCP byla silnější emise při 530 nm charakteristická pro monomerní formu JC-1.



Obrázek 4.15: Stanovení membránového potenciálu mitochondrií prostřednictvím fluorescenční mikroskopie s využitím sondy JC-1. Vybrané reprezentativní obrázky z fluorescenčního mikroskopu, které byly vytvořeny sloučením snímků z červeného a zeleného kanálu v programu Fiji (LOCI University of Wisconsin). Zachycují fluorescenční signál z fibroblastů dvou zdravých kontrol (K1 a K2) značených 0,5 μM JC-1 (část A) a 0,5 μM JC-1 s 40 μM FCCP (část B). V buňkách se zdravými mitochondriemi s normálním membránovým potenciálem se tvoří tzv. J-agregáty, které emitují červený fluorescenční signál (část A). V buňkách s depolarizovanou mitochondriální membránou, zde je poškození způsobeno přítomností FCCP, se sonda JC-1 vyskytuje převážně v monomerní formě a emituje zelený fluorescenční signál (část B). Jednotlivé snímky byly pořízeny v programu NIS-Elements BR Analysis (Nikon), při zvětšení mikroskopem 400x (Eclipse Ti2-U, Nikon).

5 Diskuze

S narůstajícím množstvím nově popsaných syndromů CDG i celkovým počtem pacientů diagnostikovaných s těmito onemocněními v posledních letech stoupá i úsilí o nalezení jednoduchých a spolehlivých metod, které by napomohly k charakterizaci defektů glykosylačních drah na buněčné úrovni a usnadnily záchyt pacientů. Klasifikace defektů CDG, a potažmo pacientů trpících těmito syndromy, není možná pouze na základě klinických příznaků. Spektrum symptomů je totiž velmi široké a liší se v závislosti na každém jednotlivém případě. To je na druhou stranu důvod, proč je nutné při hledání příčiny neobjasněných potíží o diagnóze CDG vždy uvažovat.

V první části této práce byl jako vhodný potenciální marker defektů CDG testován SNA lektin. Lektiny jsou proteiny, často izolované z rostlin, které dokážou velmi specificky rozpoznávat a vázat se na volné sacharidy nebo cukerné složky v glykokonjugátech [92]. Díky těmto vlastnostem byly lektiny již dříve využity v několika studiích pro sledování buněčného glykoproteomu [93, 94]. Pro experimenty fluorescenční mikroskopie byly vybrány fibroblasty tří zdravých kontrol (K1, K2 a K3) a jednoho pacienta (P3). U tohoto pacienta bylo pozorováno rychle progredující selhání jater vedoucí k úmrtí ve třech měsících věku, dále pak splenomegalie, koagulopatie a *cutis laxa* (volná vrásčitá kůže). Byl proveden „screening“ pomocí isoelektrické fokusace sérového transferinu a apolipoproteinu C-III, který v obou případech ukázal přítomnost hypoglykosylovaných forem a potvrdil kombinovaný defekt *N*- i *O*-glykosylace. Následně byl na základě celoexomového sekvenování diagnostikován syndrom ATP6AP1-CDG, přestože pacient netrpěl infekcemi a nebyl zasažen jeho neurologický vývoj, což jsou často se objevující symptomy u tohoto typu syndromu CDG [95]. Onemocnění velmi často rovněž provází poškození sluchu a ztráta vlasů [96]. Další laboratorní vyšetření prokázala zvýšené hladiny transaminas a snížené množství mědi a/nebo ceruloplasminu v séru pacienta P3. Tyto výsledky se shodují s publikovanými daty dalších pacientů s ATP6AP1-CDG [94, 96, 97]. Při analýze glykosylace pomocí fluorescenčně značeného PNA lektinu (z angl. *peanut agglutinin*) byl u sledovaného pacienta zachycen zvýšený signál v porovnání s kontrolami, který dokazuje sníženou sializaci glykoproteinů, konkrétně *O*-glykoproteinů mucinového typu [94].

Dříve studovaný PNA lektin se ovšem od SNA lektinu liší karbohydrátovou specifitou. Zatímco SNA lektin specificky rozpoznává terminální kyselinu sialovou, PNA lektin se v glykanu váže především na terminální galaktosu [98]. Proto není až tak překvapivé, že v případě značení SNA lektinem poskytla fluorescenční mikroskopie rozdílné výsledky. Vzorky kontrolních buněčných linií po přidání neuraminidasy vykazovaly snížený fluorescenční signál. Toto zjištění odpovídá principu metody a předpokladům, že působením neuraminidasy dochází k odštěpení koncových sialových kyselin v glykoproteinech, čímž se sníží počet vazebných míst pro SNA lektin a tím dojde i ke snížení fluorescenčního signálu. Nečekaný výsledek ukázalo vyhodnocení fluorescenčního signálu v případě pacienta P3. V porovnání s kontrolami vykazovaly tyto vzorky vyšší intenzitu signálu, a to v případě vzorku bez neuraminidasy i s neuraminidasou. To by mohlo naznačovat zvýšený výskyt hypersialovaných forem glykoproteinů, což je ovšem vzhledem k diagnostikovanému syndromu ATP6AP1-CDG velmi nepravděpodobné, spíše lze očekávat sníženou sializaci [97]. Domníváme se, že zachycený zvýšený fluorescenční signál mohl být způsoben celkově větším buněčným povrchem fibroblastů pacienta, vzhledem k tomu, že intenzita měřeného signálu byla vztažena na buňku.

Výsledky fluorescenční mikroskopie by bylo vhodné porovnat s výsledky z průtokové cytometrie. Nicméně značení buněk SNA lektinem s vyhodnocením prostřednictvím FACS opakovaně neposkytlo důvěryhodné výsledky. Ačkoli byla úspěšně provedena optimalizace koncentrace použitého SNA lektinu, která byla stanovena na 10 µg/ml (Obrázek 4.1, str. 52), následné značení více buněčných linií nebylo možné spolehlivě vyhodnotit. Detekovaný fluorescenční signál byl u všech vzorků velmi nízký. Příčina těchto technických problémů je prozatím neznámá. Pro získání validních výsledků z průtokového cytometru bude třeba změnit experimentální podmínky a provést další měření.

Dále bylo optimalizováno použití fluorescenčně značených protilátek proti proteinům CD55 a CD59 a markeru FLAER pro zachycení defektů v syntéze GPI kotvy. Při těchto analýzách byly sledovány fibroblasty tří zdravých kontrol (K1, K2 a K4) a dvě buněčné linie fibroblastů pacientů (P1 a P2).

V případě pacienta P1 byl prostřednictvím WES diagnostikován syndrom PIGN-CDG. Gen *PIGN* reguluje přímo jeden z kroků syntézy GPI kotvy, konkrétně

napojení molekuly EtNP na první Man v řetězci. Z klinických projevů byl u pacienta P1 pozorován opožděný vývoj a celkově snížený intelekt, plicní stenóza či epileptické záchvaty. Tyto příznaky se objevují i u dalších pacientů s defektem *PIGN-CDG*. Onemocnění, které je označováno jako MCAHS a je spojováno právě s mutací genu *PIGN*, dále mohou provázet časté infekce, poruchy gastrointestinálního traktu, srdeční vady, vyskytují se i oční defekty, téměř všichni pacienti pak trpí hypotonií. Naproti tomu výsledky biochemických vyšetření, které zahrnovaly jaterní či ledvinové testy, stanovení bilirubinu, glukosy, mastných kyselin, laktátu, kyseliny močové, kreatinkinasy či albuminu, neukázaly žádné významné změny v porovnání s hodnotami zdravých jedinců [54, 99, 100]. Analýzou granulocytů pacienta s defektem *PIGN-CDG* pomocí průtokové cytometrie bylo dokázáno snížení GPI-vázaného proteinu CD24 [101]. V souvislosti s poruchami biosyntézy GPI kotvy byla pomocí průtokové cytometrie zkoumána celá řada proteinů, kromě CD55 a CD59 například i CD73 nebo CD90 [102].

U pacienta P2 se jednalo o defekt genu *PISD*, který řídí přeměnu fosfatidylserinu na fosfatidylethanolamin, který je poté donorem ethanolaminfosfátu, což je jedna ze tří základních složek GPI kotvy [103]. Z klinických obtíží byla zaznamenána skeletální dysplazie, bilaterální katarakta, pacient byl malého věku a objevovaly se rovněž výkyvy v chování či občasná agresivita. Skeletální dysplazie, projevující se velmi často skoliózou páteře a defekty velkých kloubů, doprovází toto onemocnění v naprosté většině případů. Dalšími popsány symptomy u pacientů s potvrzenou mutací genu *PISD* jsou defekty dýchacích cest a respirační infekce, může docházet ke ztrátě sluchu a byly pozorovány i změny bílé hmoty v mozku. Obdobně jako v případě výše popsaného *PIGN-CDG*, tak i u deficitu *PISD* základní biochemické analýzy poskytly běžné výsledky s normálními hodnotami (analýza krve, jaterní testy, testy respirační funkce) [104–106]. Dřívější studie prováděné na fibroblastech pacientů s deficitem *PISD* zachytily změny buněčné respirace a následně bylo prokázáno poškození mitochondrií a lysozomů v důsledku snížené hladiny fosfatidylethanolaminu v buňkách [105, 107].

Výsledky získané průtokovou cytometrií (Obrázek 4.7, str. 58) a fluorescenční mikroskopií (Obrázek 4.10, str. 59) neprokázaly změnu v expresi markeru FLAER, který interaguje s GPI kotvou. Na základě těchto dat můžeme usuzovat, že při defektech genů *PIGN* i *PISD* nedochází k celkové ztrátě GPI kotvy či její úplné funkčnosti. Nicméně následující experimenty a vyhodnocení exprese GPI-vázaného proteinu CD55 pomocí fluorescenčně značených protilátek (Obrázek 4.8, str. 58, resp. Obrázek 4.11, str. 60)

ukázaly, že u obou sledovaných pacientů je GPI kotva narušena, respektive je ovlivněn právě GPI-vázaný protein CD55. Již dříve bylo prokázáno celou řadou experimentů na krevních buňkách (erytrocyty a granulocyty), že ke snížení množství tohoto proteinu dochází u pacientů s onemocněním PNH, které je v mnoha případech podmíněno mutací genu *PIGA* [75, 76, 108, 109]. Nově získané výsledky dokazují, že rovněž defekty genů *PIGN* a *PISD* mohou ovlivňovat expresi a funkci proteinu CD55, a to zřejmě nejen v krevních buňkách, ale i ve fibroblastech. V případě pacienta P1 s defektem genu *PIGN* byl pozorován výrazný pokles i u exprese proteinu CD59, ale pouze při analýze prostřednictvím fluorescenční mikroskopie (Obrázek 4.12, str. 60). Provedení dalších měření na průtokovém cytometru po změně experimentálních podmínek by mohlo potvrdit výsledky získané fluorescenční mikroskopií a tento výsledek by pak prokázal značné narušení biosyntézy GPI kotvy, respektive proteinů CD55 i CD59, při onemocnění PIGN-CDG.

Studované GPI-vázané proteiny mají důležitou funkci v ochraně buněk před lyzí řízenou komplementem. Protein CD55 napomáhá při vytváření ochranné bariéry funkčních buněk zamezením tvorby C3 konvertas, které jsou potřeba k aktivaci komplementu. Protein CD59 zabraňuje lyzi zdravých buněk inhibicí tvorby komplexu C5b-9, čímž předchází polymeraci membránolytického komplexu [75, 89]. Snížená exprese nebo poškození obou těchto proteinů může mít za následek poruchy krvetvorby (onemocnění PNH) a může vést k narušení celého systému signálních kaskád v buňce.

Mitochondriální defekty dýchacího řetězce jsou stejně jako syndromy CDG vrozenými metabolickými onemocněními, které se vyznačují velmi širokou heterogenitou symptomů podobným příznakům CDG a zasažením řady procesů v lidském organismu [110, 111]. Předpokládalo se, že lze tyto dvě skupiny odlišit na základě studia patofyziologie buňky (syndromy CDG jsou spojovány s ER a/nebo GA, defekty dýchacího řetězce souvisí s poruchou mitochondrií). Ovšem poté byly zaznamenány případy, kdy u poruchy glykosylace byla zjištěna i dysfunkce mitochondrií [112]. V této práci byla využita fluorescenčně značená sonda JC-1, která dokáže zachytit změny membránového potenciálu mitochondrií značící jejich poškození. Ačkoli byly experimenty prováděny prozatím pouze na zdravých fibroblastech kontrolních buněčných linií, ve kterých byla disipace mitochondriálního membránového potenciálu indukována přidávkou roztoku FCCP, předpokládáme, že by se tato technika dala vhodně

využít pro sledování stavu mitochondrií v buňkách i u pacientů s diagnostikovanými syndromy CDG.

Všechny experimenty provedené v rámci této diplomové práce byly vyhodnocovány prostřednictvím průtokové cytometrie i fluorescenční mikroskopie a jedním z cílů bylo porovnat výhody a nevýhody těchto dvou metod při analýze vybraných markerů CDG.

Nespornými výhodami průtokové cytometrie jsou časová nenáročnost samotné analýzy na průtokovém cytometru, vysoká citlivost a velké množství dat dostupných z jednoho měření. Touto technikou je možné zanalyzovat tisíce buněk najednou, díky čemuž získáme poměrně přesné informace o sledované buněčné populaci. Nevýhodou je poměrně zdoluhavý proces přípravy a značení fibroblastů markery, ve kterém se opakuje krok promývání vzorku a centrifugace, což by mohlo v některých případech způsobit ztrátu buněk, poškození jejich částí nebo změnu jejich vlastností.

Fluorescenční mikroskopie je poměrně jednoduchá technika, při které jsou analyzované buňky velmi citlivě značeny, a protože zůstávají stále adharované na povrchu podložního sklíčka, nedochází k jejich mechanickému poškození. Její nejspíše největší výhodou je, že lze pozorovat morfologii každé jednotlivé buňky a zároveň tak z vyhodnocení případně vyloučit buňky poškozené. Navíc množství kultivovaných buněk potřebných pro tuto metodu je mnohonásobně nižší než v případě průtokové cytometrie. Dále můžeme celkem přesně určit lokalizaci sledovaného markeru ve značené buňce a výrazné změny v expresi markerů jsou patrné ihned. Složitější je v případě fluorescenční mikroskopie proces kvantifikace fluorescenčního signálu, který byl v tomto případě analyzován na základě ručního výběru vyhodnocované oblasti, což může výsledky ovlivnit.

V případě sledování sializace pomocí fluorescenčně značeného SNA lektinu nebyly získány validní výsledky technikou FACS, tudíž shodu výsledků s FM bude možné potvrdit až po dalších experimentech. Nicméně FM pomohla vyloučit problém s některým z klíčových reaktantů tohoto značení (nefunkční neuraminidasa, nefunkční SNA lektin). Při analýze specifických markerů GPI kotvy byla data získaná FACS potvrzena i FM (pro FLAER a CD55). V případě CD59 poskytla FM v případě jednoho pacienta (P1) zásadně rozdílný výsledek v porovnání s FACS a poukázala na možný falešně zvýšený fluorescenční signál při FACS vznikající nespecifickými interakcemi. Na

základě toho budou výsledky FACS znovu zkoumány a přeměřovány. Při sledování mitochondriálního membránového potenciálu byly pozorovány shodné výsledky. Výhodou byla v tomto případě možnost sledovat stavbu a přeměnu mitochondriální sítě prostřednictvím FM.

Porovnáme-li výsledky exprese studovaných markerů získané těmito dvěma technikami, v žádném z provedených experimentů nebyly získány zcela odlišné výsledky a lze konstatovat, že se jedná o vhodné komplementární metody. Využití značení fibroblastů SNA lektinem pro diagnostiku CDG bude zřejmě poměrně složité, jelikož ho provází řada komplikací, například vliv velikosti a povrchu buněk na intenzitu pozorovaného signálu. Tento problém by mohl být nejspíš vyřešen normalizací fluorescenčního signálu na velikost nebo plochu buňky. Rovněž ovšem získané výsledky neukázaly, že by značení SNA lektinem pomohlo odlišit fibroblasty pacientů s CDG od kontrolních linií. Naopak použití specifických markerů GPI kotvy v našich experimentech umožnilo detekovat poruchu GPI kotvy u pacientů, u kterých byl defekt diagnostikován geneticky, ačkoli běžně používaný CDG „screening“ ho nedokázal zachytit. Proto se markery GPI kotvy jeví jako nadějně zejména pro defekty biosyntézy GPI kotvy a syndromy CDG zasahující do více glykosylačních drah najednou, pro které nebylo zatím příliš mnoho analýz nalezeno a klasický „screening“ CDG je nedostačující.

6 Souhrn

Tato diplomová práce se zabývala studiem biochemických analýz, které by napomohly při diagnostice a charakterizaci pacientů s dědičnými poruchami glykosylace. Provedené experimenty v kultivovaných fibroblastech poskytly tyto výsledky:

- Byla optimalizována detekce sializace pomocí fluorescenčně značeného SNA lektinu s vyhodnocením prostřednictvím průtokové cytometrie (FACS) i fluorescenční mikroskopie (FM).
- Analýza exprese fluorescenčně značeného GPI markeru FLAER neprokázala žádnou změnu množství GPI kotvy u PIGN-CDG a deficitu PISD v porovnání se zdravými kontrolami.
- U PIGN-CDG a PISD deficitu byla prokázána snížená exprese proteinu CD55 v porovnání se zdravými kontrolami (o 71 % (FACS), o 35 % (FM) u PIGN-CDG, resp. o 43 % (FACS), o 26 % (FM) u PISD defektu).
- U PIGN-CDG byl metodou fluorescenční mikroskopie zaznamenán pokles exprese CD59 o 51 % v porovnání se zdravými kontrolami.
- Byla optimalizována analýza změn mitochondriálního membránového potenciálu pomocí fluorescenčně značené sondy JC-1 se simulací defektu mitochondrií pomocí FCCP.
- Průtokovou cytometrii a fluorescenční mikroskopii lze považovat za vhodné techniky, které se vzájemně doplňují, při diagnostice pacientů s CDG.

Seznam použité literatury

- [1] Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N.: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. **1473**:1, 4–8 (1999).
- [2] Whitford, D.: *Proteins: Structure and Function*. West Sussex, John Wiley & Sons, 2005.
- [3] Varki, A.; Gagneux, P.: Biological Functions of Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453034/>> [cit. 11. 3. 2021].
- [4] Spiro, R. G.: Glycoproteins. *Adv Protein Chem*. **27**, 349–467 (1973).
- [5] Varki, A.; Kornfeld, S.: Historical Background and Overview. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/>> [cit. 11. 3. 2021].
- [6] Lis, H.; Sharon, N.: Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem*. **218**:1, 1–27 (1993).
- [7] Freeze, H. H.; Hart, G. W.; Schnaar, R. L.: Glycosylation Precursors. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453043/>> [cit. 11. 3. 2021].
- [8] Rudd, P. M.; Dwek, R. A.: Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. **32**:1, 1–100 (1997).

- [9] Ohtsubo, K.; Marth, J. D.: Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*. **126**:5, 855–867 (2006).
- [10] Reily, C.; Stewart, T. J.; Renfrow, M. B.; Novak, J.: Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. **15**:6, 346–366 (2019).
- [11] Hart, G. W.: Glycosylation. *Current Opinion in Cell Biology*. **4**:6, 1017–1023 (1992).
- [12] Wopereis, S.: *O-glycosylation in health and disease*. Wageningen, Ponsen & Looijen BV, 2006.
- [13] Daleo, G. R.; Hopp, H. E.; Romero, P. A.; Pont Lezica, R.: Biosynthesis of dolichol phosphate by subcellular fractions from liver. *FEBS Lett*. **81**:2, 411–414 (1977).
- [14] Stanley, P.; Taniguchi, N.; Aebi, M.: N-Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/>> [cit. 13. 3. 2021].
- [15] Schwarz, F.; Aebi, M.: Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*. **21**:5, 576–582 (2011).
- [16] Nilsson, B.: Analysis of protein glycosylation by mass spektrometry. *Mol Biotechnol*. **2**:3, 243–280 (1994).
- [17] Taylor, M. E.; Drickamer, K.: *Introduction to Glycobiology*. 3. vydání. Oxford, Oxford University Press, 2011.
- [18] Brockhausen, I.; Stanley, P.: O-GalNAc Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453030/>> [cit. 14. 3. 2021].
- [19] Wopereis, S.; Lefeber, D. J.; Morava, E.; Wevers, R. A.: Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin Chem*. **52**:4, 574–600 (2006).

- [20] Perez-Vilar, J.; Hill, R. L.: The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem.* **274**:45, 31751–31754 (1999).
- [21] Hounsell, E. F.; Davies, M. J.; Renouf, D. V.: O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate J.* **13**:1, 19–26 (1996).
- [22] Van den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G.: Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **33**:3, 151–208 (1998).
- [23] Hart, G. W.; Akimoto, Y.: The O-GlcNAc Modification. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1954/>> [cit. 14. 3. 2021].
- [24] Zachara, N. E.; Hart, G. W.: Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids.* **1761**:5, 599–617 (2006).
- [25] Pinnell, S. R.; Fox, R.; Krane, S. M.: „Human collagens: Differences in glycosylated hydroxylysines in skin and bone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure.* **229**:1, 119–122 (1971).
- [26] Endo, T.: O-mannosyl glycans in mammals. *Biochim Biophys Acta.* **1473**:1, 237–246 (1999).
- [27] Wang, Y.; Shao, L.; Shi, S.; Harris, R. J.; Spellman, M. W.; Stanley, P.; Haltiwanger, R. S.: Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J Biol Chem.* **276**:43, 40338–40345 (2001).
- [28] Miyoshi, E.; Moriwaki, K.; Nakagawa, T.: Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem.* **143**:6, 725–729 (2008).
- [29] Ferguson, M. A.; Kinoshita, T.; Hart, G. W.: Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): Cold

Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1966/>> [cit. 14. 3. 2021].

[30] Kinoshita, T.; Ohishi, K.; Takeda, J.: GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *J Biochem.* **122**:2, 251–257 (1997).

[31] Kinoshita, T.: Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. *Open Biol.* **10**:3, 190290 (2020).

[32] Treumann, A.; Lively, M. R.; Schneider, P.; Ferguson, M. A.: Primary structure of CD52. *J Biol Chem.* **270**:11, 6088–6099 (1995).

[33] Tanaka, S.; Maeda, Y.; Tashima, Y.; Kinoshita, T.: Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *J Biol Chem.* **279**:14, 14256–14263 (2004).

[34] Fujita, M.; Watanabe, R.; Jaensch, N.; Romanova-Michaelides, M.; Satoh, T.; Kato, M.; Riezman, H.; Yamaguchi, Y.; Maeda, Y.; Kinoshita, T.: Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. *J Cell Biol.* **194**:1, 61–75 (2011).

[35] Maeda, Y.; Tashima, Y.; Houjou, T.; Fujita, M.; Yoko-o, T.; Jigami, Y.; Taguchi, R.; Kinoshita, T.: Fatty Acid Remodeling of GPI-anchored Proteins Is Required for Their Raft Association. *Mol Biol Cell.* **18**:4, 1497–1506 (2007).

[36] Hirata, T.; Mishra, S. K.; Nakamura, S.; Saito, K.; Motooka, D.; Takada, Y.; Kanzawa, N.; Murakami, Y.; Maeda, Y.; Fujita, M.; Yamaguchi, Y.; Kinoshita, T.: Identification of a Golgi GPI-N-acetylgalactosamine transferase with tandem transmembrane regions in the catalytic domain. *Nat Commun.* **9**:1, 405 (2018).

[37] UniProt Consortium: UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* **43** (Database issue), D204-212 (2015).

[38] Höchsmann, B.; Murakami, Y.; Osato, M.; Knaus, A.; Kawamoto, M.; Inoue, N.; Hirata, T.; Murata, S.; Anliker, M.; Eggermann, T.; Jäger, M.; Floettmann, R.; Höllein, A.; Murase, S.; Ueda, Y.; Nishimura, J.; Kanakura, Y.; Kohara, N.; Schrezenmeier, H.; Krawitz, P. M.; Kinoshita, T.: Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation. *J Clin Invest.* **129**:12, 5123–5136 (2019).

- [39] Jaeken, J.; Vanderschueren-Lodeweyckx, M.; Casaer, P.; Snoeck, L.; Corbeel, L.; Eggermont, E.; Eeckels, R.: Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?: 90. *Pediatric Research*. **14**:2, 179 (1980).
- [40] Ondruskova, N.; Cechova, A.; Hansikova, H.; Honzik, T.; Jaeken, J.: Congenital disorders of glycosylation: Still “hot” in 2020". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. **1865**:1, 129751 (2021).
- [41] Chang, I. J.; He, M.; Lam, C. T.: Congenital disorders of glycosylation. *Ann Transl Med*. **6**:24, 477 (2018).
- [42] Ng, B. G.; Freeze, H. H.: Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders. *Trends in Genetics*. **34**:6, 466–476 (2018).
- [43] Jaeken, J.: Congenital disorders of glycosylation. *Ann N Y Acad Sci*. **1214**, 190–198 (2010).
- [44] Altassan, R.; Péanne, R.; Jaeken, J.; Barone, R.; Bidet, M.; Borgel, D.; Brasil, S.; Cassiman, D.; Cechova, A.; Coman, D.; Corral, J.; Correia, J.; Morena-Barrio, M. E.; Lonlay, P.; Dos Reis, V.; Ferreira, C. R.; Fiumara, A.; Francisco, R.; Freeze, H.; Funke, S.; Gardeitchik, T.; Matthijs, G.; Girad, M.; Giros, M.; Grünewald, S.; Hernández-Caselles, T.; Honzik, T.; Hutter, M.; Krasnewich, D.; Lam, C.; Lee, J.; Lefeber, D.; Marques-de-Silva, D.; Martinez, A. F.; Moravej, H.; Öunap, K.; Pascoal, C.; Pascreau, T.; Patterson, M.; Quelhas, D.; Raymond, K.; Sarkhail, P.; Schiff, M.; Seroczyńska, M.; Serrano, M.; Seta, N.; Sykut-Cegielska, J.; Thiel, C.; Tort, F.; Vals, M.; Videira, P.; Witters, P.; Zeevaert, R.; Morava, E.: International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. **42**:1, 5–28 (2019).
- [45] Matthijs, G.; Schollen, E.; Bjursell, C.; Erlandson, A.; Freeze, H.; Imtiaz, F.; Kjaergaard, S.; Martinsson, T.; Schwartz, M.; Seta, N.; Vuillaumier-Barrot, S.; Westphal, V.; Winchester, B.: Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat*. **16**:5, 386–394 (2000).

- [46] Cromphout, K.; Vleugels, W.; Heykants, L.; Schollen, E.; Keldermans, L.; Sciot, R.; D'Hooge, R.; De Deyn, P. P.; Figura, K.; Hartmann, D.; Körner, C.; Matthijs, G.: The normal phenotype of Pmm1-deficient mice suggests that Pmm1 is not essential for normal mouse development. *Mol Cell Biol.* **26**:15, 5621–5635 (2006).
- [47] Péanne, R.; De Lonlay, P.; Foulquier, F.; Kornak, U.; Lefeber, D. J.; Morava, E.; Pérez, B.; Seta, N.; Thiel, C.; Van Schaftingen, E.; Matthijs, G.; Jaeken, J.: Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis. *Eur J Med Genet.* **61**:11, 643–663 (2018).
- [48] Vajsar, J.; Schachter, H.: Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* **1**:1, 29 (2006).
- [49] Diesen, C.; Saarinen, A.; Pihko, H.; Rosenlew, C.; Cormand, B.; Dobyns, W. B.; Dieguez, J.; Valanne, L.; Joensuu, T.; Lehesjoki, A.: POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet.* **41**:10, e115 (2004).
- [50] Jezela-Stanek, A.; Ciara, E.; Piekutowska-Abramczuk, D.; Trubicka, J.; Jurkiewicz, E.; Rokicki, D.; Mierzevska, H.; Spychalska, J.; Uhrynowska, M.; Szwarc-Bronikowska, M.; Buda, P.; Said, A. R.; Jamroz, E.; Rydzanicz, M.; Płoski, R.; Krajewska-Walasek, M.; Pronicka, E.: Congenital disorder of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis—The phenotype of two patients with novel mutations in the PIGN and PGAP2 genes. *European Journal of Paediatric Neurology.* **20**:3, 462–473 (2016).
- [51] Jaeken, J.; Péanne, R.: What is new in CDG. *J Inherit Metab Dis.* **40**:4, 569–586 (2017).
- [52] Bayat, A.; Kløvgaard, M.; Johannesen, K. M.; Barakat, T. S.; Kievit, A.; Montomoli, M.; Parrini, E.; Pietrafusa, N.; Schelhaas, J.; Slegtenhorst, M.; Miya, K.; Guerrini, R.; Tranebjærg, L.; Tümer, Z.; Rubboli, G.; Møller, R. S.: Deciphering the premature mortality in PIGA-CDG – An untold story. *Epilepsy Research.* **170**, 106530 (2021).
- [53] Hill, A.; DeZern, A. E.; Kinoshita, T.; Brodsky, R. A.: Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Primers.* **3**, 17028 (2017).
- [54] Maydan, G.; Noyman, I.; Har-Zahav, A.; Neriah, Z. B.; Pasmanik-Chor, M.; Yeheskel, A.; Albin-Kaplanski, A.; Maya, I.; Magal, N.; Birk, E.; Simon, A. J.; Halevy, A.; Rechavi, G.; Shohat, M.; Straussberg, R.; Basel-Vanagaite, L.: Multiple congenital

anomalies-hypotonia-seizures syndrome is caused by a mutation in PIGN. *J Med Genet.* **48**:6, 383–389 (2011).

[55] McInerney-Leo, A. M.; Harris, J. E.; Gattas, M.; Peach, E. E.; Sinnott, S.; Dudding-Byth, T.; Rajagopalan, S.; Barnett, C. P.; Anderson, L. K.; Wheeler, L.; Brown, M. A.; Leo, P. J.; Wicking, C.; Duncan, E. L.: Fryns Syndrome Associated with Recessive Mutations in PIGN in two Separate Families. *Hum Mutat.* **37**:7, 695–702 (2016).

[56] Slavotinek, A.: Fryns Syndrome. In: *GeneReviews*. Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Pagon, R. A.; Wallace, S. E.; Bean, L. J.; Mirzaa, G.; Amemiya, A. (Eds.). Seattle (WA), University of Washington, 1993. Dostupné z URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1459/>> [cit. 16. 6. 2021].

[57] Bruneel, A.; Cholet, S.; Tran, N. T.; Mai, T. D.; Fenaille, F.: CDG biochemical screening: Where do we stand. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.* **1864**:10, 129652 (2020).

[58] Francisco, R.; Marques-da-Silva, D.; Brasil, S.; Pascoal, C.; Dos Reis Ferreira, V.; Morava, E.; Jaeken, J.: The challenge of CDG diagnosis. *Mol Genet Metab.* **126**:1, 1–5 (2019).

[59] Lefeber, D. J.; Morava, E.; Jaeken, J.: How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* **34**:4, 849 (2011).

[60] Gomme, P. T.; McCann, K. B.; Bertolini, J.: Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today.* **10**:4, 267–273 (2005).

[61] Bergström, J. P.; Helander, A.: Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: Implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. *Clinica Chimica Acta.* **388**:1, 59–67 (2008).

[62] Clerc, F.; Reiding, K. R.; Jansen, B. C.; Kammeijer, G. S. M.; Bondt, A.; Wuhrer, M.: Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J.* **33**:3, 309–343 (2016).

[63] Thiel, C.; Meßner-Schmitt, D.; Hoffmann, G. F.; Körner, C.: Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* **36**:5, 887–892 (2013).

- [64] Butler, M.; Quelhas, D.; Critchley, A. J.; Carchon, H.; Hebestreit, H. F.; Hibbert, R. G.; Vilarinho, L.; Teles, E.; Matthijs, G.; Schollen, E.; Argibay, P.; Harvey, D. J.; Dwek, R. A.; Jaeken, J.; Rudd, P. M.: Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. *Glycobiology*. **13**:9, 601–622 (2003).
- [65] Sadat, M. A.; Moir, S.; Chun, T.; Lusso, P.; Kaplan, G.; Wolfe, L.; Memoli, M. J.; He, M.; Vega, H.; Kim, L. J. Y.; Huang, Y.; Hussein, N.; Nievas, E.; Mitchell, R.; Garofalo, M.; Louie, A.; Ireland, D. C.; Grunes, C.; Cimbrow, R.; Patel, V.; Holzapfel, G.; Salahuddin, D.; Bristol, T.; Adams, D.; Marciano, B. E.; Hegde, M.; Li, Y.; Calvo, K. R.; Stoddard, J.; Justement, J. S.; Jacques, J.; Long Priel, D. A.; Murray, D.; Sun, P.; Kuhns, D. B.; Boerkoel, C. F.; Chiorini, J. A.; Di Pasquale, G.; Verthelyi, D.; Rosenzweig, S. D.: Glycosylation, hypogammaglobulinemia, and resistance to viral infections. *N Engl J Med*. **370**:17, 1615–1625 (2014).
- [66] Bruneel, A.; Robert, T.; Leféber, D. J.; Benard, G.; Loncle, E.; Djedour, A.; Durand, G.; Seta, N.: Two-dimensional gel electrophoresis of apolipoprotein C-III and other serum glycoproteins for the combined screening of human congenital disorders of O- and N-glycosylation. *PROTEOMICS – Clinical Applications*. **1**:3, 321–324 (2007).
- [67] Ramms, B.; Gordts, P. L. S. M.: Apolipoprotein C-III in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. **29**:3, 171–179 (2018).
- [68] Wopereis, S.; Grünewald, S.; Morava, E.; Penzien, J. M.; Briones, P.; García-Silva, M. T.; Demacker, P. N. M.; Huijben, K. M. L. C.; Wevers, R. A.: Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem*. **49**:11, 1839–1845 (2003).
- [69] Harvey, S. B.; Zhang, Y.; Wilson-Grady, J.; Monkkonen, T.; Nelsestuen, G. L.; Kasthuri, R. S.; Verneris, M. R.; Lund, T. C.; Wesley Ely, E.; Bernard, G. R.; Zeisler, H.; Homoncik, M.; Jilma, B.; Swan, T.; Kellogg, T. A.: O-glycoside biomarker of apolipoprotein C3: responsiveness to obesity, bariatric surgery, and therapy with metformin, to chronic or severe liver disease and to mortality in severe sepsis and graft vs host disease. *J Proteome Res*. **8**:2, 603–612 (2009).

- [70] Puglia, M. J.; Valdes, R.; Jortani, S. A.: Bikunin (Urinary Trypsin Inhibitor): Structure, Biological Relevance, And Measurement. *Adv Clin Chem.* **44**, 223–245 (2007).
- [71] Zhuo, L.; Salustri, A.; Kimata, K.: A physiological function of serum proteoglycan bikunin: the chondroitin sulfate moiety plays a central role. *Glycoconj J.* **19**:4–5, 241–247 (2002).
- [72] Bruneel, A.; Dubail, J.; Roseau, C.; Prada, P.; Haouari, W.; Huber, C.; Dupré, T.; Poüs, C.; Cormier-Daire, V.; Seta, N.: Serum bikunin is a biomarker of linkeropathies. *Clinica Chimica Acta.* **485**, 178–180 (2018).
- [73] Bouchet-Séraphin, C.; Vuillaumier-Barrot, S.; Seta, N.: Dystroglycanopathies: About Numerous Genes Involved in Glycosylation of One Single Glycoprotein. *J Neuromuscul Dis.* **2**:1, 27–38 (2015).
- [74] Svahn, J.; Laforêt, P.; Vial, C.; Streichenberger, N.; Romero, N.; Bouchet-Séraphin, C.; Bruneel, A.; Dupré, T.; Seta, N.; Menassa, R.; Michel-Calemard, L.; Stojkovic, T.: Dilated cardiomyopathy and limb-girdle muscular dystrophy-dystroglycanopathy due to novel pathogenic variants in the DPM3 gene. *Neuromuscular Disorders.* **29**:7, 497–502 (2019).
- [75] Ruiz-Argüelles, A.; Llorente, L.: The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmunity Reviews.* **6**:3, 155–161 (2007).
- [76] Sutherland, D. R.; Kuek, N.; Davidson, J.; Barth, D.; Chang, H.; Yeo, E.; Bamford, S.; Chin-Yee, I.; Keeney, M.: Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* **72**:3, 167–177 (2007).
- [77] Jaeken, J.; Eijk, H. G.; Heul, C.; Corbeel, L.; Eeckels, R.; Eggermont, E.: Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clinica Chimica Acta.* **144**:2, 245–247 (1984).
- [78] Quintana, E.; Navarro-Sastre, A.; Hernández-Pérez, J. M.; García-Villoria, J.; Montero, R.; Artuch, R.; Ribes, A.; Briones, P.: Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): Transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF). *Clinical Biochemistry.* **42**:4, 408–415 (2009).

- [79] Ruel, C.; Morani, M.; Bruneel, A.; Junot, C.; Taverna, M.; Fenaille, F.; Tran, N. T.: A capillary zone electrophoresis method for detection of Apolipoprotein C-III glycoforms and other related artifactually modified species. *Journal of Chromatography A*. **1532**, 238–245 (2018).
- [80] Jones, M. A.; Rhodenizer, D.; Silva, C.; Huff, I. J.; Keong, L.; Bean, L. J. H.; Coffee, B.; Collins, C.; Tanner, A. K.; He, M.; Hegde, M. R.: Molecular diagnostic testing for congenital disorders of glycosylation (CDG): Detection rate for single gene testing and next generation sequencing panel testing. *Molecular Genetics and Metabolism*. **110**:1, 78–85 (2013).
- [81] Mandy, F. F.; Bergeron, M.; Minkus, T.: Principles of flow cytometry. *Transfusion Science*. **16**:4, 303–314 (1995).
- [82] Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A.: Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. **37**:2, 163–176 (2017).
- [83] Naeem, A.; James, N.; Tanvir, M.; Marriam, M.; Nathaniel, S.: Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS): An Advanced Cell Sorting Technique. *PSM Biol Res*. **2**:2, 83–88 (2017).
- [84] Young, M. R.: Principles and Technique of Fluorescence Microscopy. *Journal of Cell Science*. **s3-102**:60, 419–449 (1961).
- [85] Monici, M.: Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*. **11**, 227–256 (2005).
- [86] Coling, D.; Kachar, B.: Principles and application of fluorescence microscopy. *Curr Protoc Mol Biol*. **14**, část 14.10 (2001).
- [87] Sanderson, M. J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. D.: Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. **2014**:10, pdb.top071795 (2014).
- [88] Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A.: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. **9**:7, 676–682 (2012).
- [89] Brodsky, R. A.: How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. **113**:26, 6522–6527 (2009).

- [90] Sivandzade, F.; Bhalerao, A.; Cucullo, L.: Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protoc.* **9**:1, e3128 (2019).
- [91] Molecular probes: *JC-1 and JC-9 Mitochondrial Potential Sensors*. Dostupné z URL: <<https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp03168.pdf>> [cit. 16. 6. 2021].
- [92] Chrispeels, M. J.; Raikhel, N. V.: Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell.* **3**:1, 1–9 (1991).
- [93] La Belle, J. T.; Gerlach, J. Q.; Svarovsky, S.; Joshi, L.: Label-Free Impedimetric Detection of Glycan–Lectin Interactions. *Anal. Chem.* **79**:18, 6959–6964 (2007).
- [94] Ondruskova, N.; Honzik, T.; Vondrackova, A.; Stranecky, V.; Tesarova, M.; Zeman, J.; Hansikova, H.: Severe phenotype of ATP6AP1-CDG in two siblings with a novel mutation leading to a differential tissue-specific ATP6AP1 protein pattern, cellular oxidative stress and hepatic copper accumulation. *J Inherit Metab Dis.* **43**:4, 694–700 (2020).
- [95] Jansen, E. J. R.; Timal, S.; Ryan, M.; Ashikov, A.; Scherpenzeel, M.; Graham, L. A.; Mandel, H.; Hoischen, A.; Iancu, T. C.; Raymond, K.; Steenbergen, G.; Gilissen, C.; Huijben, K.; Bakel, N. H. M.; Maeda, Y.; Rodenburg, R. J.; Adamowicz, M.; Crushell, E.; Koenen, H.; Adams, D.; Vodopiutz, J.; Greber-Platzer, S.; Müller, T.; Dueckers, G.; Morava, E.; Sykut-Cegielska, J.; Martens, G. J. M.; Wevers, R. A.; Niehues, T.; Huynen, M. A.; Veltman, J. A.; Stevens, T. H.; Lefeber, D. J.: ATP6AP1 deficiency causes an immunodeficiency with hepatopathy, cognitive impairment and abnormal protein glycosylation. *Nat Commun.* **7**:1, 11600 (2016).
- [96] Lipiński, P.; Rokicki, D.; Bogdańska, A.; Lesiak, J.; Lefeber, D. J.; Tylki-Szymańska, A.: ATP6AP1-CDG: Follow-up and female phenotype. *JIMD Reports.* **53**:1, 80–82 (2020).
- [97] Dimitrov, B.; Himmelreich, N.; Hipgrave Ederveen, A. L.; Lüchtenborg, C.; Okun, J. G.; Breuer, M.; Hutter, A.; Carl, M.; Guglielmi, L.; Hellwig, A.; Thiemann, K. C.; Jost, M.; Peters, V.; Staufner, C.; Hoffmann, G. F.; Hackenberg, A.; Paramasivam, N.; Wiemann, S.; Eils, R.; Schlesner, M.; Strahl, S.; Brügger, B.; Wuhrer, M.; Korenke, G. C.; Thiel, C.: Cutis laxa, exocrine pancreatic insufficiency and altered cellular

metabolomics as additional symptoms in a new patient with ATP6AP1-CDG. *Molecular Genetics and Metabolism*. **123**:3, 364–374 (2018).

[98] Iskratsch, T.; Braun, A.; Paschinger, K.; Wilson, I. B. H.: Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Analytical Biochemistry*. **386**:2, 133–146 (2009).

[99] Khayat, M.; Tilghman, J. M.; Chervinsky, I.; Zalman, L.; Chakravarti, A.; Shalev, S. A.: A PIGN Mutation Responsible for Multiple Congenital Anomalies–Hypotonia–Seizures Syndrome 1 (MCAHS1) in an Israeli–Arab Family. *Am J Med Genet A*. **170A**:1, 176–182 (2016).

[100] Knaus, A.; Pantel, J. T.; Pendziwiat, M.; Hajjir, N.; Zhao, M.; Hsieh, T.; Schubach, M.; Gurovich, Y.; Fleischer, N.; Jäger, M.; Köhler, S.; Muhle, H.; Korff, C.; Möller, R. S.; Bayat, A.; Calvas, P.; Chassaing, N.; Warren, H.; Skinner, S.; Louie, R.; Evers, C.; Bohn, M.; Christen, H.; Born, M.; Obersztyn, E.; Charzewska, A.; Endziniene, M.; Kortüm, F.; Brown, N.; Robinson, P. N.; Schelhaas, H. J.; Weber, Y.; Helbig, I.; Mundlos, S.; Horn, D.; Krawitz, P. M.: Characterization of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects by clinical features, flow cytometry, and automated image analysis. *Genome Med*. **10**:1, 3 (2018).

[101] Nakagawa, T.; Taniguchi-Ikeda, M.; Murakami, Y.; Nakamura, S.; Motooka, D.; Emoto, T.; Satake, W.; Nishiyama, M.; Toyoshima, D.; Morisada, N.; Takada, S.; Tairaku, S.; Okamoto, N.; Morioka, I.; Kurahashi, H.; Toda, T.; Kinoshita, T.; Iijima, K.: A novel PIGN mutation and prenatal diagnosis of inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Am J Med Genet A*. **170A**:1, 183–188 (2016).

[102] Zhao, J. J.; Halvardson, J.; Knaus, A.; Georgii-Hemming, P.; Baeck, P.; Krawitz, P. M.; Thureson, A.; Feuk, L.: Reduced cell surface levels of GPI-linked markers in a new case with PIGG loss of function. *Hum Mutat*. **38**:10, 1394–1401 (2017).

[103] Patel, D.; Witt, S. N.: Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*. **2017**, 4829180 (2017).

[104] Peter, V. G.; Quinodoz, M.; Pinto-Basto, J.; Sousa, S. B.; Di Gioia, S. A.; Soares, G.; Ferraz Leal, G.; Silva, E. D.; Pescini Gobert, R.; Miyake, N.; Matsumoto, N.; Engle, E. C.; Unger, S.; Shapiro, F.; Superti-Furga, A.; Rivolta, C.; Campos-Xavier, B.: The Liberfarb syndrome, a multisystem disorder affecting eye, ear, bone, and brain

development, is caused by a founder pathogenic variant in the PISD gene. *Genet Med.* **21**:12, 2734–2743 (2019).

[105] Zhao, T.; Goedhart, C. M.; Sam, P. N.; Sabouny, R.; Lingrell, S.; Cornish, A. J.; Lamont, R. E.; Bernier, F. P.; Sinasac, D.; Parboosingh, J. S.; Care4Rare Canada Consortium; Vance, J. E.; Claypool, S. M.; Innes, A. M.; Shutt, T. E.: PISD is a mitochondrial disease gene causing skeletal dysplasia, cataracts, and white matter changes. *Life Sci Alliance.* **2**:2, e201900353 (2019).

[106] Girisha, K. M.; Elsner, L.; Neethukrishna, K.; Muranjan, M.; Shukla, A.; SriLakshmi Bhavani, G.; Nishimura, G.; Kutsche, K.; Mortier, G.: The homozygous variant c.797G>A/p.(Cys266Tyr) in PISD is associated with a Spondyloepimetaphyseal dysplasia with large epiphyses and disturbed mitochondrial function. *Hum Mutat.* **40**:3, 299–309 (2019).

[107] Tasseva, G.; Bai, H. D.; Davidescu, M.; Haromy, A.; Michelakis, E.; Vance, J. E.: Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* **288**:6, 4158–4173 (2013).

[108] Oelschlaegel, U.; Besson, I.; Arnoulet, C.; Sainty, D.; Nowak, R.; Naumann, R.; Bux, Y.; Ehninger, G.: A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol.* **23**:2, 81–90 (2001).

[109] Rahman, K.; Gupta, R.; Yadav, G.; Husein, N.; Singh, M. K.; Nityanand, S.: Fluorescent Aerolysin (FLAER)-based paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) screening: a single center experience from India. *Int J Lab Hematol.* **39**:3, 261–271 (2017).

[110] Gorman, G. S.; Chinnery, P. F.; DiMauro, S.; Hirano, M.; Koga, Y.; McFarland, R.; Suomalainen, A.; Thorburn, D. R.; Zeviani, M.; Turnbull, T. M.: Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers.* **2**, 16080 (2016).

[111] Freeze, H. H.; Eklund, E. A.; Ng, B. G.; Patterson, M. C.: NEUROLOGICAL ASPECTS OF HUMAN GLYCOSYLATION DISORDERS. *Annu Rev Neurosci.* **38**, 105–125 (2015).

[112] Kong, J.; Peng, M.; Ostrovsky, J.; Kwon, Y. J.; Oretsky, O.; McCormick, E. M.; He, M.; Argon, Y.; Falk, M. J.: Mitochondrial function requires NGLY1. *Mitochondrion*. **38**, 6–16 (2018).

Přílohy

Prezentace výsledků diplomové práce na konferencích

Šárka Veselá, Nina Ondrušková, Martin Báječný, Jan Živný, Jiří Zeman, Tomáš Honzík, Hana Hansíková. **Porovnání využití průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie pro charakteristiku defektů v syntéze glykosylfosfatidylinositolu**, 22. SVK 1. LF UK, 2021, Praha, Česká republika.

Poruchy syntézy glykosylfosfatidylinositolu (GPI) jsou skupinou genetických metabolických onemocnění a charakteristicky se projevují změnou exprese a funkčností proteinů vázaných GPI kotvou. Dosud bylo definováno 22 typů těchto defektů a jejich počet v poslední době stále narůstá. Důsledky defektů jsou standardně zkoumány průtokovou cytometrií (FACS) vzorků z krve a fibroblastů pacientů s použitím specifických GPI markerů.

Cílem práce bylo porovnat dvě odlišné metody pro stanovení exprese těchto markerů. Pro experimenty byly použity kultivované fibroblasty 3 zdravých kontrol, pacientky s mutací v PIGN genu podílejícím se na syntéze GPI kotvy a pacienta s mutací v genu PISD ovlivňujícím syntézu fosfatidylethanolaminu. Buňky byly značeny fluorescenčně vázaným FLAER a protilátkami proti CD55 a CD59 (Exbio). Signál byl analyzován použitím FACS, BD FACSCanto (BD Biosciences), a fluorescenční mikroskopie (FM), Eclipse Ti2-U (Nikon).

Výsledky FACS neukázaly žádnou změnu v expresi FLAER nebo CD59 v buňkách pacientů v porovnání s kontrolami, zatímco exprese CD55 byla výrazně snížena u obou pacientů. Tato data byla potvrzena FM. Naproti tomu FM odhalila významný pokles signálu CD59 u pacientky s PIGN defektem, který nebyl pomocí FACS zachycen.

Pilotní výsledky ukazují na nižší produkci GPI vázaného proteinu CD55 při defektu PIGN i PISD. Rozdíly v detekci CD59 mezi FACS a FM ve fibroblastech budou vyžadovat další experimenty.

Podporováno SVV 260367 a 8F 19002 EURO-GLYCAN-OMICS.

Klíčová slova: glykosylfosfatidylinositol, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie

Ročník: 2.

Porovnání využití průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie pro charakteristiku defektů v syntéze glykosylfosfatidylinositolu

22. SVK 1. LF, Praha

20. 5. 2021



¹Šárka Veselá

¹N. Ondrušková, ²M. Bájecný, ²J. Živný, ¹J. Zeman, ¹T. Honzik, ¹H. Hansíková

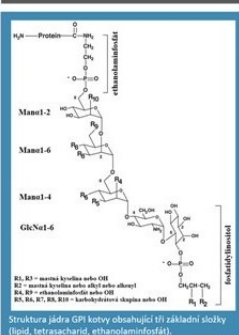
¹Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

²Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Podporováno SVV 260367 a 8F 19002 EURO-GLYCAN-OMICS.



Úvod



- glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva
 - molekulární aparát připojující proteiny na buněčnou membránu (více než 150 různých proteinů)
 - 3 složky: lipid, tetrasacharid, ethanolaminfosfát
- poruchy syntézy glykosylfosfatidylinositolu
 - skupina vrozených metabolických onemocnění
 - 22 definovaných podtypů
 - změny exprese a funkčnosti proteinů vázaných GPI kotvou
 - defekt v genu *PIGN* – chybná syntéza GPI kotvy
 - defekt v genu *PISD* – chybná syntéza ethanolaminfosfátu
- diagnostika
 - celoexomové sekvenování
 - biochemická analýza
 - specifické markery s fluorescenční značkou
 - analýza vzorků z krve či fibroblastů
 - využití průtokové cytometrie

Cíle práce

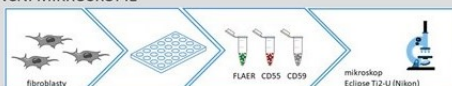
Cílem práce bylo **stanovit a porovnat expresi specifických GPI markerů** pomocí metod průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie.

Metody

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE



FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

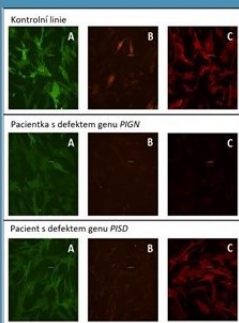


Materiál

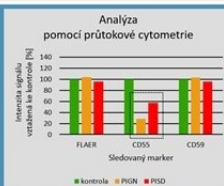
- kultivované fibroblasty
 - 3 zdravé kontroly (2 muži, 1 žena)
 - 1 pacientka s mutací v genu *PIGN*
 - 1 pacient s mutací v genu *PISD*

- GPI markery
 - FLAER (Cedarlane Laboratories)
 - protilátka proti CD55 (Exbio)
 - protilátka proti CD59 (Exbio)

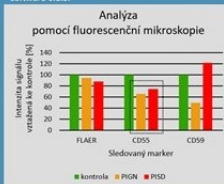
Výsledky



Fluorescenční mikroskopie (NIS-Elements BR Analysis).
A – FLAER, B – CD55, C – CD59.



Výsledky byly vyhodnocovány v programu BD FACSDiva software 6.1.3.



Výsledky byly získány v programu NIS-Elements BR Analysis a vyhodnocovány pomocí Fiji (ImageJ).

Souhrn

- PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE
 - výrazně snížená exprese CD55 u obou pacientů (o 71 % u *PIGN* defektu, o 43 % u *PISD* defektu) v porovnání s kontrolami
- FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE
 - výrazně snížená exprese CD55 u obou pacientů v porovnání s kontrolami
 - významně nižší signál CD59 v případě pacientky s defektem genu *PIGN*
- Při defektech genů *PISD* i *PIGN* dochází ke snížené produkci GPI vázaného proteinu CD55.
 - Expresí proteinu CD59 bude vyžadovat další experimenty.

Obrázek 8.1: Poster prezentovaný na 22. SVK 1. LF UK. Část diplomové práce zabývající se markery GPI kotvy byla prezentována na 22. SVK LF UK (20. 5. 2021).

S. Vesela, N. Ondruskova, M. Bajecny, J. Zivny, J. Zeman, T. Honzik, H. Hansikova. **Comparison of flow cytometry versus immunocytochemistry analysis in the characterization of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects**, *International Scientific CDG Symposium on Congenital Disorders of Glycosylation and related disorders*, 2021, Praha, Česká republika.

Background: Defects in glycosylphosphatidylinositol (GPI) biosynthesis (GPIBD) are a heterogeneous group of rare genetic metabolic diseases characterized by a compromised function of GPI-anchored proteins due to deficiencies of enzymes involved in GPI synthesis, its transfer to target proteins and the following GPI-anchor modifications. The number of newly identified GPIBD has significantly increased in recent years, making a total of 22 subtypes described up to date. To assess the functional impact of patient mutations, specific GPI-anchored proteins (markers) are standardly analyzed in the blood and fibroblasts using flow cytometry. The aim of our study was to compare two methodical approaches for determining the expression of the selected markers.

Material and methods: The experiments were performed in the cultured fibroblasts from 3 healthy controls (2 male, 1 female), a girl with GPIBD caused by a mutation in *PIGN* gene, and a boy diagnosed with *PISD* defect, which impairs the formation of phosphatidylethanolamine, thus possibly affecting GPI-anchor biosynthesis. After labelling the cells with fluorescently-tagged FLAER (which binds to GPI anchor) and the antibodies to CD55 and CD59, the signal was evaluated using either flow cytometry (FC) or fluorescent microscopy (immunocytochemistry, ICC).

Results: Using flow cytometry, no change was detected in the expression of FLAER or CD59 in the patient cells compared to the controls (median values, $\pm 2SD$). In contrast, CD55 was significantly lower in both patients: reduction to 29 % and 57 % of the control values was found in *PIGN* and *PISD* defect, respectively. CD55 decrease in the two patients was confirmed by ICC, which (similarly to FC) showed no change in FLAER intensity. However, ICC staining revealed a substantial decrease of CD59 in the *PIGN* defect, while the level was normal in *PISD* deficiency. Notably, a relatively high heterogeneity in the signal intensity between cells from the same fibroblast line was observed using ICC, suggesting it is more appropriate to use median (rather than mean) values.

Conclusions: Our pilot experiments employing both FC and ICC techniques in cultured fibroblasts uncovered a reduction in the expression of the GPI-anchored protein CD55 in *PIGN* as well as in *PISD* defect, which is a novel finding. A discrepancy in the evaluation of CD59 level was found between FC and ICC analyses, inquiring further investigation.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení (s adresou)	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka